

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Romana Velvarská

**Stanovení enzymové aktivity cellobiasy pomocí kapilární
elektroforézy**

Determination of enzyme activity of cellobiase using capillary
electrophoresis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 6. května 2014.

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za jeho cenné rady, ochotu a čas, který mi byl věnován během zpracovávání daného tématu a který by se rovněž neobešel bez trpělivosti a vzbuzeného nadšení pro danou věc.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací podmínek kapilární elektroforézy při separaci nezreagovaného substrátu a produktů (cellobiosa, glukosa), které vznikají při enzymovém štěpení cellotriosy enzymem cellobiasou. Jako optimální separační elektrolyt se ukázal roztok obsahující $30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxid sodný s přidavkem $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosforečnanu sodného a $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydrogenfosforečnanu sodného ($\text{pH} = 12,38$). S tímto separačním elektrolytem byly změřeny kalibrační závislosti, opakovatelnosti měření, zjištěny meze detekce a stanovitelnosti. Relativní směrodatné odchylky ploch píků se pohybovaly do 6,1 % a u migračních časů nepřesáhly hodnotu 0,2 %. Meze detekce byly stanoveny v rozmezí $0,020 - 0,026 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a meze stanovitelnosti od $0,066 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $0,085 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Následně byla sledována enzymová reakce v offline provedení. Dále bylo offline provedení automatizováno, kdy se relativní směrodatné odchylky ploch cellodextrinů po 30 minutách hydrolýzy pohybovaly do 13,0 % pro cellotriosu a glukosu, a do 3,0 % pro cellobiosu. Automatizovaná metoda je tedy vhodná pro semi-kvantitativní a srovnávací měření. Poslední částí experimentu byla snaha uskutečnit enzymové štěpení v online uspořádání, které bylo přes vyzkoušení všech možných variant mísení neúspěšné a nemohlo být použito k provedení enzymového štěpení cellotriosy cellobiasou uvnitř kapiláry s následnou separací produktů.

Klíčová slova

Enzymová aktivita, kapilární elektroforéza, bezkontaktní vodivostní detekce, sacharidy.

Abstract

This thesis deals with optimization of capillary electrophoresis conditions for the separation of unreacted substrate and products (cellobiose, glucose) generated by the enzymatic cleavage of cellotriose with enzyme cellobiase. The optimal separation electrolyte was shown to be a solution containing $30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ sodium hydroxide with addition of $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ sodium phosphate and $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ sodium phosphate dibasic ($\text{pH} = 12.38$). With this separation electrolyte calibration curves and repeatability were measured and the limits of detection and quantification were determined. The relative standard deviations of peak areas ranged up to 6.1 % and they did not exceed 0.2 % for the migration time. Limits of detection were determined in the range from 0.020 to 0.026 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ and limits of quantification from 0.066 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ to 0.085 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Subsequently the enzyme reaction was monitored in offline setup. Furthermore, the offline procedure was automated and the relative standard deviation of cellodextrines after 30 minutes of hydrolysis was ranging up to 13.0 % of glucose and cellotriose and 3.0 % cellobiose using this automated method, which makes it suitable for semiquantitative and comparative measurements. The last part of the experiment was to carry out enzymatic reaction in online setup. Despite testing all possible variations of mixing, it was not possible to perform cleavage of cellotriose by cellobiase inside the capillary with subsequent separation of products.

Keywords

Enzyme activity, capillary electrophoresis, contactless conductivity detection, saccharides.

Obsah

1	Cíl práce.....	- 11 -
2	Teoretický úvod	- 12 -
2.1	Cellulosa jako alternativní energetický zdroj.....	- 12 -
2.2	Hydrolyza cellulasy	- 13 -
2.3	Cellobiasa (EC 3.2.1.21).....	- 14 -
2.4	Separace sacharidů.....	- 14 -
2.4.1	Historický vývoj.....	- 14 -
2.4.2	Kapilární zónová elektroforéza a separace sacharidů	- 16 -
2.4.3	Možné způsoby detekce v CZE	- 17 -
2.4.4	Bezkontaktní vodivostní detekce	- 17 -
2.4.5	Možné způsoby separace a detekce sacharidů v CZE.....	- 19 -
2.5	Studium enzymové aktivity pomocí kapilární elektroforézy	- 19 -
2.6	Elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza (EMMA)	- 21 -
2.6.1	Využití EMMA v praxi	- 23 -
3	Experimentální část.....	- 25 -
3.1	Použité chemikálie a přístroje	- 25 -
3.1.1	Chemikálie	- 25 -
3.1.2	Použitý software.....	- 25 -
3.1.3	Příprava separačních elektrolytů	- 25 -
3.1.4	Příprava roztoků a provedení enzymové reakce	- 25 -
3.1.5	Přístrojové vybavení.....	- 26 -
3.2	Popis experimentů	- 27 -
3.2.1	Optimalizace separace cellodextrinů.....	- 27 -
3.2.2	Offline uspořádání.....	- 27 -
3.2.3	Automatizace stanovení v offline uspořádání.....	- 28 -

3.2.4	Online uspořádání	- 28 -
4	Výsledky a diskuze.....	- 29 -
4.1	Optimalizace složení separačního elektrolytu	- 29 -
4.1.1	Vliv koncentrace NaOH na separaci po přidavku fosfátového pufru	- 31 -
4.2	Opakovatelnost měření	- 35 -
4.3	Kalibrační závislosti.....	- 37 -
4.4	Stanovení meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ)	- 38 -
4.5	Enzymové štěpení v offline uspořádání	- 38 -
4.6	Automatizace enzymového štěpení v offline uspořádání.....	- 41 -
4.7	Enzymové štěpení v online uspořádání.....	- 42 -
5	Závěr	- 44 -
6	Použité zdroje	- 46 -

Použité zkratky

CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
C ⁴ D	bezkontaktní vodivostní detekce
LIF	laserem indukovaná fluorescence
ECD	elektrochemická detekce
ECL	elektrochemiluminiscenční detekce
MS	hmotnostní spektrometrie
DAD	detektor s diodovým polem
LOD	mez detekce ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)
LOQ	mez stanovitelnosti ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)
EMMA	elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza

Seznam obrázků

- Obrázek 1** Produkty vznikající při enzymovém štěpení cellulosity.
- Obrázek 2** Umístění elektrod v bezkontaktním vodivostním detektoru kolem separační kapiláry.
- Obrázek 3** Schéma mísení zón v EMMA na základě rozdílných elektroforetických pohyblivostí.
- Obrázek 4** Simulace mísení zón v kapiláře na základě TDLFP.
- Obrázek 5** Separace cellodextrinů v $30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného.
- Obrázek 6** Separace cellodextrinů v $75 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného.
- Obrázek 7** Vliv koncentrace hydroxidu sodného v $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátovém pufru na separaci sacharidů.
- Obrázek 8** Závislost pohyblivosti EOF na koncentraci hydroxidu sodného v separačním elektrolytu.
- Obrázek 9** Závislost efektivní pohyblivosti jednotlivých cellodextrinů na koncentraci hydroxidu sodného v separačním elektrolytu.
- Obrázek 10** Enzymové štěpení cellotriosy v $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ acetátovém pufru.
- Obrázek 11** Enzymové štěpení cellotriosy v $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ acetátovém pufru.
- Obrázek 12** Automatizované enzymové štěpení v offline uspořádání.

Seznam tabulek

- Tabulka 1** Rozlišení mezi píky jednotlivých cellodextrinů.
- Tabulka 2** Opakovatelnost zjištěných ploch píků cellodextrinů.
- Tabulka 3** Opakovatelnost zjištěných migračních časů cellodextrinů.
- Tabulka 4** Parametry kalibračních závislostí cellodextrinů (n=24).
- Tabulka 5** Meze detekce a meze stanovitelnosti cellodextrinů.
- Tabulka 6** Výsledky Lordova testu pro přidavek acetátového pufru o koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.
- Tabulka 7** Relativní směrodatné odchylky koncentrací cellodextrinů po 30 minutách enzymového štěpení při automatickém dávkování enzymu.

1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo v první řadě optimalizovat podmínky kapilární zónové elektroforézy pro separaci celotriosy a produktů její hydrolýzy enzymem cellobiasou. V průběhu experimentu byly stanoveny opakovatelnosti měření, meze detekce a stanovitelnosti a změřeny kalibrační závislosti. Vyvinutá metoda byla následně použita ke stanovení enzymové aktivity enzymu v offline uspořádání, přičemž bylo nutno přizpůsobit a optimalizovat podmínky pro enzymovou hydrolýzu. Dalším krokem bylo testování různých způsobů automatizace metody pomocí dostupné techniky, které by v ideálním případě mělo vést k provádění enzymové hydrolýzy v tzv. online uspořádání přímo uvnitř separační kapiláry.

2 Teoretický úvod

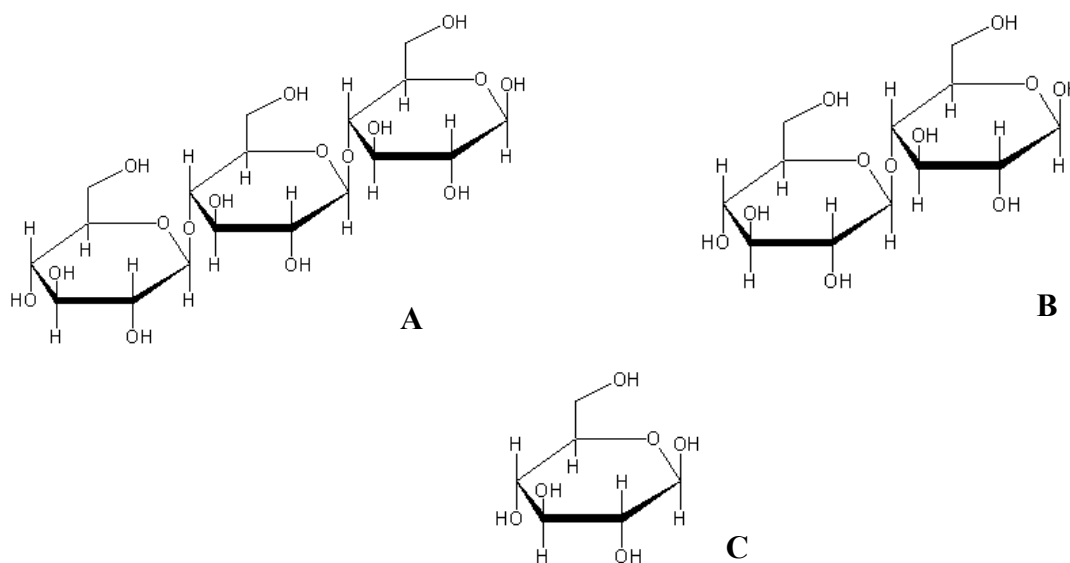
2.1 Cellulosa jako alternativní energetický zdroj

V dnešní době se čím dál víc společnost zaměřuje na řešení globálních problémů, jež nás jako lidstvo celkově ohrožují. Těchto problémů existuje celá řada a jedním z nich se stala výroba a spotřeba paliv, která jsou v současnosti vyráběna především z neobnovitelných energetických zdrojů, proto se v posledních několika desetiletích objevila snaha nahradit tyto neobnovitelné energetické zdroje zdroji alternativními jako jeden z hlavních cílů výzkumu [1]. Jedním z možných řešení pro snížení závislosti na fosilních palivech je přeměna biomasy na tzv. biopaliva, jež mohou výrazně zvýšit energetickou bezpečnost, nicméně jejich využití a ekonomický potenciál je značně omezen [2]. Velmi efektivním se ukázalo štěpení cellulitické biomasy na bioethanol pomocí enzymů. Řešení této problematiky započalo již v 70. let 20. století, kdy skupina vedená M. Mandelsem publikovala studie o enzymovém štěpení cellulose až na glukosu, jež lze dále za využití bakterií či kvasinek fermentovat na ethanol [3, 4, 5]. První zmínky o cellulose jako takové pochází z roku 1944, kdy byly představeny studie struktury rostlinných buněk, kde byl tento polysacharid označen za hlavní strukturní jednotku. Následně byla cellulosa označena za nejdůležitější a nejvíce zastoupený biopolymer v biosféře [6]. Kromě funkce jakožto hlavního strukturního komponentu rostlin, našla cellulosa své uplatnění i v oblasti průmyslu od výroby papíru až po dnešní trend biopaliv [7].

Co se týká struktury samotné cellulose, jedná se o lineární polysacharid obsahující glukosové jednotky spojené β -1,4-glykosidovou vazbou. Hydrolýzou tohoto polysacharidu lze získat tzv. cellodextriny, což jsou sloučeniny obsahující různý počet glukosových jednotek, přičemž podle jejich počtu v základním řetězci se odvozují další oligosacharidy jako např. cellobiosa, cellotriosa, cellotetraosa případně vyšší cellodextriny, ve kterých se základní monomer opakuje dvakrát, třikrát, čtyřikrát, případně vícekrát. Za pomoci specifických enzymů, které jsou charakteristické pro danou skupinu látek, lze tyto sacharidy dále hydrolyzovat až na samotnou glukosu, jež dále slouží jako základní substrát pro výrobu biopaliva [1].

2.2 Hydrolýza cellulosity

Samotná výroba bioethanolu se skládá ze dvou základních kroků, kterými jsou jednak efektivní hydrolýza cellulosity až na glukosu a jednak fermentace glukosy na bioethanol. Druhý krok přeměny, tedy konverze glukosy na biopalivo se uskutečňuje za pomoci kvasinek či specifických bakterií a není limitujícím krokem, tím se stává štěpení cellulosity pomocí enzymů až na základní monomer, neboť rychlost tohoto kroku je značně ovlivněna nejen enzymovou aktivitou, ale také strukturními vlastnostmi substrátu [8]. Samotné štěpení polysacharidu lze rovněž rozdělit do dvou základních procesů, kdy je nejprve cellulosa hydrolyzována pomocí dvou enzymů a to β -1,4-endoglukanasou a β -1,4-exoglukanasou. Produktem se stávají cellobiosové případně vyšší cellodextrinové jednotky. Cellobiosa, redukující disacharid, však inhibuje aktivitu zmíněných enzymů a proto při tomto štěpení nevzniká požadovaný konečný produkt glukosa. Aby bylo možné vzniklé cellodextriny dále hydrolyzovat je nutno využít jiný enzym a to celobiasu, která je schopna rozložit cellobiosu až na glukosu, zároveň byla prokázána aktivita enzymu i vůči vyšším cellodextrinům. Jako v případě prvního štěpení cellulosity i zde produkt rozkladu působí inhibičně na enzym a z toho důvodu se stává nezbytným dodržet optimální podmínky pro hydrolýzu, tedy pH, teplotní optimum či přítomnost látek podporující aktivitu, aby došlo k nejefektivnějšímu rozkladu [3,9]. Při kontrole technologických procesů je třeba aktivitu enzymu kontrolovat, což je možné například pomocí kapilární elektroforézy.



Obrázek 1 Produkty vznikající při enzymovém štěpení cellulosity. (A) cellotriosa, (B) cellobiosa, (C) glukosa.

2.3 Cellobiasa (EC 3.2.1.21)

Enzymy, které jsou vysoce účinné a selektivní biokatalyzátory, mají veliký význam v metabolismech všech organismů. Katalyzují téměř všechny chemické reakce v živé přírodě a jejich nesprávná funkce vede ke vzniku řady chorob a metabolických abnormalit. Z toho důvodu je potřeba porozumět jejich funkci, aktivitě či inhibici a případně se snažit zabránit vzniku metabolických poruch, nebo jejich funkci využít a zefektivnit v průmyslu [10].

Při štěpení cellobiosy (případně vyšších cellodextrinů), jak již bylo řečeno, působí vzniklý produkt (glukosa) jako inhibitor na štěpící enzym (cellobiasu). Tato inhibice je kompetitivní, proto se za dostatečně dlouhou dobu nakonec přemění všechny substrát na produkt [8]. Nejlepšími producenty cellobiasy se ukázaly mikroorganismy rodu *Aspergillus*, aktivita vyprodukovaného enzymu byla několikanásobně vyšší než u enzymů z jiných rodů mikroorganismů [11, 12]. Optimální hodnota pH pro cellobiasu je v rozmezí 4,0 – 4,8 a izoelektrický bod tohoto enzymu byl stanoven kolem hodnoty 5 [13, 14].

Cellobiasa, jakožto β -glukosidasa, štěpí glykosidovou vazbu redukujících sacharidů za vzniku β -D-glukosy, přičemž štěpení je doprovázeno zmíněnou inhibicí a z toho důvodu se objevuje snaha inhibici eliminovat a co nejvíce zvýšit aktivitu enzymu vůči substrátu. Přítomnost cellobiasy byla prokázána i u člověka jakožto jejího producenta, tato forma hydrolasy při nesprávné funkci způsobuje Gaucherovu chorobu [15].

2.4 Separace sacharidů

2.4.1 Historický vývoj

První zmínky o separaci sacharidů pochází z roku 1943, kdy A. Tiselius navrhl metodu separace glukosy a sacharosy, která využívala dřevěné uhlí. To se již dříve používalo pro průmyslové čištění sacharidů. A. Tiselius využil dřevěné uhlí a vodný roztok fenolu pro oddělení glukosy od sacharosy, jejichž roztok byl dávkován do sloupce naplněného dřevěným uhlím. Whistler a Durso v roce 1950 jeho separační techniku vylepšili a rozšířili na separace mono-, di- a trisacharidů za využití ethanolu o vyšších koncentracích [16]. Jimi vyvinutá metoda však neřešila problém separace sacharidových isomerů. Odseparováním sacharidových isomerů se zabýval A. B. Foster, který v roce 1953 využil iontoforézu na filtračním papíře (později metoda známá jako zónová

elektroforéza) k odseparování šesti D-glukodisacharidů, kde jedním ze separovaných sacharidů byla zároveň cellobiosa. Jako separační elektrolyt byl využit roztok kyseliny borité, kdy docházelo k tvorbě dvou typů negativně nabitých komplexů mezi hydroxylovými skupinami sacharidů a boritanovými ionty [17].

V roce 1951 byla dále publikována studie zabývající se odseparováním sacharidů, které obsahovaly laktonové či esterové skupiny. K tomuto účelu byla využita metoda papírové chromatografie. Pomocí směsi buthanol-ethanol-voda došlo k odseparování některých sacharidových laktonů, avšak tato směs se ukázala nevhodná pro separaci acetátů sacharidových alkoholů [18]. V následujících několika letech se pokračovalo v separaci sacharidů a různých jejich derivátů např. pomocí kokosového dřevěného uhlí, či byly provedeny separace na dřevěném uhlí za přítomnosti molybdenanu [19, 20]. Plynová chromatografie byla v roce 1965 rovněž využita k separaci sacharidů, konkrétně protonovaných a deuteriovaných forem α - a β -glukosy [21]. Jako další separační technika pro sacharidy byly vyzkoušeny iontoměničové pryskyřice. V této metodě se stal detekčním činidlem roztok orcinolu v koncentrované kyselině sírové a jako separační pufr byl použit roztok borátu. Tímto způsobem se podařilo odseparovat od sebe 16 sacharidů během čtyř hodin a technika se ukázala vhodná pro analýzu tělních tekutin [22]. Od 90. let 20. století se využívala pro separace méně těkavých látek především technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), metoda byla vyzkoušena také na separace sacharidů. Metoda HPLC se stala výhodnou zejména proto, že poskytovala lepší selektivitu než tradiční chemické metody, byla méně nákladná než enzymové metody a nebyla potřeba sacharidy derivatizovat, jako je tomu u plynové chromatografie.

Díky nízkým absorbancím sacharidů v UV oblasti elektromagnetického spektra se standardně využívala jako detekční technika metoda měření indexu lomu. Měření indexu lomu však neposkytovalo dostatečně nízké detekční meze, proto byla v roce 1982 využita metoda ampérometrické detekce, jež poskytovala až 100× nižší detekční meze než metoda měření indexu lomu, a to 4,6 $\mu\text{g/ml}$ dextrosy [23]. V průběhu roku 1991 byl publikován článek zabývající se stanovením velmi malých množství sacharidů po separaci vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. V této studii bylo dosaženo mezí detekce pod 10 pmol pro redukující sacharidy, kdy jako značkovací činidlo byl využit taurocyamin. Pro detekci neredukujících sacharidů bylo nutné přidat k činidlu jodistan [24]. Ve stejném roce byla již využita pro separace sacharidů technika kapilární zónové elektroforézy s laserem indukovanou fluorescencí jako detekční technikou. Nedocházelo zde k přímé detekci sacharidů, nýbrž jejich derivátů, které vznikly po reduktivní aminaci. Po optimalizaci

metody bylo dosaženo detekčních mezí až na úrovni attomol (konkrétně 0,5 attomol pro deriváty galaktosy) [25]. Využití CZE jako separační techniky se ukázalo velmi účinné a praktické, proto se tato metoda začala v praxi více uplatňovat, avšak přes své přednosti nikdy nedokázala zastítnit metodu HPLC, jež je v dnešní době, spolu s plynovou chromatografií, nejvyužívanější separační technikou.

2.4.2 Kapilární zónová elektroforéza a separace sacharidů

Rozvoj kapilární zónové elektroforézy započal od roku 1979, kdy se začaly objevovat první studie s využitím této separační techniky [26, 27]. Na dalším rozvoji této analytické metody se podílela skupina Lukacse, která v roce 1981 publikovala další úspěšné separace za využití zmíněné separační techniky. Tehdy se separace prováděla v otevřených skleněných kapilárách, tubulárního tvaru a technika byla vyzkoušena na separaci aminokyselin, peptidů a močových aminů [28]. Kapilární zónová elektroforéza byla o 8 let později využita k separaci jodičnanů a jodistanů a metoda se ukázala jako užitečná při oxidačních analýzách sacharidů [29]. O další 3 roky později byla již využita tato metoda při separaci sacharidů jak s přímou, tak nepřímou UV detekcí. Meze přímé detekce se pohybovaly v desítkách fmol, kdy bylo nutné sacharidy derivatizovat, avšak při nepřímé detekci bylo dosaženo detekčních mezí až v pmol, bez nutnosti derivatizace [30]. Díky své vysoké rozlišovací schopnosti se začala kapilární elektroforéza využívat k separaci sacharidů, které zahrnují široké spektrum látek, z nichž mnohé jsou isomery nebo se jen mírně odlišují od sebe navzájem. Nicméně pro efektivní využití zmíněné separační techniky je potřeba nejprve překonat řadu obtíží, charakteristických pro tuto skupinu látek.

Kapilární zónová elektroforéza se využívá pro separaci sacharidů zejména pro její bezesporné výhody, mezi něž patří možnost využití různých druhů detektorů, účinnost separace srovnatelná s účinností plynové chromatografie, případně vyšší, dále nízká spotřeba vzorků, snadná automatizace kvantitativní analýzy a v neposlední řadě metoda je použitelná pro širší výběr analytů ve srovnání s jinými separačními technikami [31].

2.4.3 Možné způsoby detekce v CZE

Jednou ze zmiňovaných výhod CZE je možnost využití různých druhů detekce v závislosti na povaze stanovovaných látek. Nejběžněji se využívají UV detektory pracující na principu diodového pole (DAD), ty jsou však vhodné pouze pro látky, které absorbují UV záření, pro ostatní látky musí být využit jiný způsob detekování. Přesto využití v praxi činí největší zastoupení a to až 68 % ze všech druhů detektorů a zároveň se tento způsob detekce nejvíce uplatňuje při analýzách potravin a zjišťování jejich kontaminace. Pro stanovení analytů lze rovněž využít elektrochemiluminiscenční detekci (ECL), využití této techniky v praxi se pohybuje kolem 4 %, dále laserem indukovanou fluorescenci (LIF), jejíž zastoupení se odhaduje na 5 %. U těchto technik detekce, ECL a LIF, je možno dosáhnout až tisíckrát vyšší citlivosti než u UV detektorů. Procentuální zastoupení využití elektrochemické detekce (ECD) se uvádí 10 %. Od roku 1980 bylo zavedeno spojení CE-MS, kdy dochází k detekci analytů za pomoci hmotnostní spektrometrie, metoda se především využívá ke stanovení komponent v komplexních směsích, kde se ukázala tato kombinace jako vysoce efektivní. Hmotnostní detektory patří mezi druhé nejvíce využívané detektory (16 %) [32].

2.4.4 Bezkontaktní vodivostní detekce

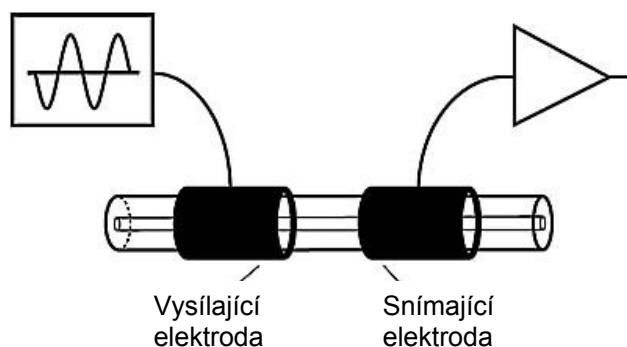
Bezkontaktní vodivostní detektor je vysokofrekvenční impedanční zařízení schopné měřit vodivost a permitivitu roztoků v kapilárách, jimiž prochází vysokofrekvenční signál, a proto není potřeba elektrody umísťovat přímo do analyzovaného roztoku, tím pádem zde nedochází k degradaci či změně vlastností elektrod. Na druhou stranu by interakce mezi elektrodou a roztokem mohly přispět k větší citlivosti a selektivitě příslušného detektoru. Detektor obsahuje dvě elektrody, jednou z nich prochází střídavý proud o frekvenci řádově stovky kHz. Druhá elektroda snímá střídavý proud, jenž prošel roztokem, ten je usměrněn, zesílen a registrován [33].

Byl zkoumán vliv vnitřního průměru separační kapiláry při použití separačních roztoků o různé vodivosti na chování detektoru. Výsledkem této studie byl závěr, že s rostoucím vnitřním průměrem kapiláry (75 μm), roste šum základní linie při využití vodivějšího separačního elektrolytu, což nepříznivě ovlivňuje mez detekce a mez stanovitelnosti. Pro koncentrovanější základní elektrolyty s větší vodivostí je proto vhodnější využití separační kapiláry s menším vnitřním průměrem, kdy díky menšímu

poměru signálu k šumu nedochází k tak značnému ovlivnění LOD a LOQ a zároveň s menším vnitřním průměrem separační kapiláry se zlepšuje separace jednotlivých analytů [34].

$C^{4}D$ detektor je možno využít pro detekci sacharidů, které neabsorbují UV záření, a pro které tedy není možné použít běžnější UV detektory [35]. Bezkontaktní vodivostní detekce se ukázala jako velmi vhodná metoda detekce látek v biochemických a klinických studiích. Pomocí tohoto detektoru byly úspěšně stanoveny jak peptidy, tak proteiny, dále anorganické látky v krvi a močové elektrolyty [36, 37, 38, 39, 40]. Úspěšné uplatnění našel tento způsob detekce i na poli enzymových reakcí, díky $C^{4}D$ bylo možné detekovat produkty enzymového štěpení, které nebylo možno stanovit UV detekcí [41]. V roce 1998 byl poprvé tento způsob detekce využit ve spojení s kapilární zónovou elektroforézou skupinou Zemanna. V publikované studii bylo dosaženo detekčních limitů pro anorganické kationty a anionty kolem 200 ppb [42].

V současné době je prozatím využití bezkontaktního vodivostního detektoru v praxi pouhá 2 % [32], avšak je to slibná a alternativní metoda pro stanovení ionizovaných analytů, jež nemají chromofor, či pro případy, kdy použití absorpční sondy pro nepřímou UV detekci může mít negativní vliv na separaci. Mezi výhody tohoto detektoru patří nižší pořizovací cena, nižší provozní náklady, dále použitelnost v miniaturních zařízeních a široké využití pro řadu analytů [43,44]. Na **obrázku 2** je znázorněno schéma umístění elektrod kolem separační kapiláry v bezkontaktním vodivostním detektoru.



Obrázek 2 Umístění elektrod v bezkontaktním vodivostním detektoru kolem separační kapiláry. Vysílající elektroda – elektroda vysílající vysokofrekvenční signál, snímající elektroda – elektroda snímající střídavý proud, jež prošel analyzovaným roztokem [45].

2.4.5 Možné způsoby separace a detekce sacharidů v CZE

Většina sacharidů postrádá snadno ionizovatelné funkční skupiny, kromě několika přirozeně nabitých mono- a oligosacharidů, a proto tyto sacharidy nemohou v elektrickém poli migrovat. Dále většina z nich neabsorbuje UV/VIS záření, ani nefluoreskuje, čímž je znemožněna jejich citlivá detekce pomocí UV absorpčního nebo fluorescenčního detektoru [46]. Řešením problémů s migrací a detekcí se ukázala možnost sacharidy derivatizovat například pomocí N-(trimethylsilyl)imidazolu v pyridinu, čímž se docílí zvýšení citlivosti, protože sacharidy tak získají elektrický náboj a absorpční/fluorescenční vlastnosti. Přímé detekce mono- a disacharidů bylo dosaženo v kapiláře při komplexaci s boritany, tyto komplexy jednak vykazovaly záporný náboj, takže mohly být separovány, jednak se citlivost UV detekce zvýšila na tolik, že bylo možné sacharidy detekovat při 195 nm [47]. Další možností je zvýšení citlivosti díky komplexaci s Cu^{2+} v alkalickém separačním mediu nebo využití separačního elektrolytu obsahujícího chromofory a tím pádem stanovit sacharidy nepřímou UV detekcí [48]. Pro separace sacharidů (nevyjímaje cellodextrinů), které je obtížné detekovat pomocí DAD detektoru, je dále možno použít bezkontaktní vodivostní detekci. Tuto metodu popsala v roce 2003 skupina Carvaleho, která separovala glukosu, galaktosu a fruktosu za využití separačního elektrolytu o vysoké hodnotě pH [49]. Využitím zmíněného elektrolytu lze docílit disociace hydroxylových skupin sacharidů a tím pádem se neutrální analyty stávají anionty, které vykazují vlastní elektroforetickou pohyblivost a které je možno detekovat tímto bezkontaktním vodivostním detektorem [35].

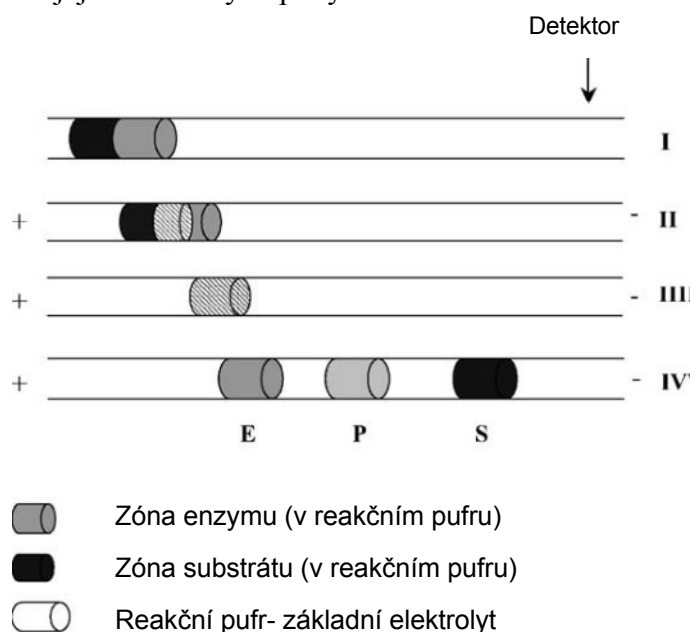
2.5 Studium enzymové aktivity pomocí kapilární elektroforézy

K studiu enzymové aktivity, kinetiky, ke stanovení Michaelisovy konstanty, k identifikaci produktů enzymového štěpení, ke sledování inhibitorů či aktivátorů reakcí a k studiu metabolických cest enzymů se tradičně využívá UV/VIS absorpční případně fluorescenční spektrometrie. V případech, kdy se substrát a produkt enzymové reakce neliší svými spektrometrickými vlastnostmi a není k dispozici vhodný chromogenní substrát, je nutno sáhnout po separačních metodách, jakou je také kapilární elektroforéza [50]. Tato separační metoda je vhodná zejména pro svou univerzálnost, rychlost analýzy, pro spotřebu velmi malých objemů vzorků (10 nl – 10 μ l), meze detekce na úrovni nanogramů a díky svému vysokému rozlišení. Všechny tyto vlastnosti v kombinaci s vysokou účinností a reprodukovatelností vedou k využití CZE místo HPLC ke studiu

enzymových reakcí. Metoda CZE byla využita ke studiu enzymové aktivity karboxypeptidasy A na substrátech methotrexát- α -peptidů, kdy produkt hydrolyzy (v tomto případě methotrexát) má stejné absorpční spektrum jako substrát a z toho důvodu jej nebylo možno stanovit spektrofotometricky. Experiment byl proveden tak, že vždy docházelo k mísení substrátu a enzymu ve vialce a následnému průběhu enzymové reakce po určitou dobu, poté byly produkty dávkovány do přístroje, odseparovány a odděleně detekovány. Toto uspořádání je v dnešní době známe jako offline či pre-kapilární uspořádání [51]. Kapilární zónová elektroforéza nabízí ještě další dvě uspořádání pro studium enzymových reakcí. Druhým způsobem provedení experimentů je tzv. in-kapilární (online) způsob, znám rovněž jako elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza (electrophoretically mediated microanalysis, EMMA), kdy se reagující látky dávkuje přímo do kapiláry, která tak slouží jako mikroreaktor a enzymová reakce probíhá uvnitř v mikroměřítku (viz kap. 2.6.). Třetím, posledním uzpůsobením, je tzv. post-kapilární uspořádání, které bylo vyvinuto skupinou Emmer a Roeraade [52]. V tomto uspořádání jsou zabudovány dva detektory (konkrétně UV detektory) a využity dvě kapiláry, jedna separační a druhá reakční. Separační kapilára, o menším vnitřním průměru je vložena do kapiláry reakční, jejíž vnitřní průměr je přibližně 10× větší než průměr separační kapiláry. Do reakční kapiláry se dávkuje substrát, přičemž separační kapilára je naplněna separačním elektrolytem a dochází v ní k separaci dvou enzymů, které jsou po odseparování detekovány prvním UV detektorem. Tato vnitřní separační kapilára je ukončena před druhým UV detektorem ve vzdálenosti 1-3 mm, dochází tak k vlévání separačního elektrolytu s enzymy do roztoku obsahujícího substrát a k průběhu enzymové hydrolyzy. Po promísení těchto složek dochází po vložení vnějšího napětí k odseparování jednotlivých produktů a následnému detekování pomocí vhodného detektoru [41, 52]. Post-kapilární uspořádání bohužel není možné provádět na komerčně vyráběných kapilárních elektroforézách. A. Schucher-Shi, P. Kubáň a P. Hauser využili bezkontaktní vodivostní detekci ve spojení s kapilární elektroforézou v roce 2007 k monitorování enzymových reakcí, kde vystupovaly jako substráty ethanol, glukosa, ethylacetát a ethylbutyrát. Reakčními enzymy pak byly hexokinasa, glukosaoxidas, alkoholdehydrogenasa a esterasa. Detekční limit byl zde stanoven pro ethylacetát a dosahoval $7,0 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [41]. O dva roky později stejná skupina využila CE- C^4D metodu ke stanovení několika peptidů, jež vznikají při štěpení bílkovin pepsinem a trypsinem. Stanovení bylo realizováno v offline i online módu CE [53].

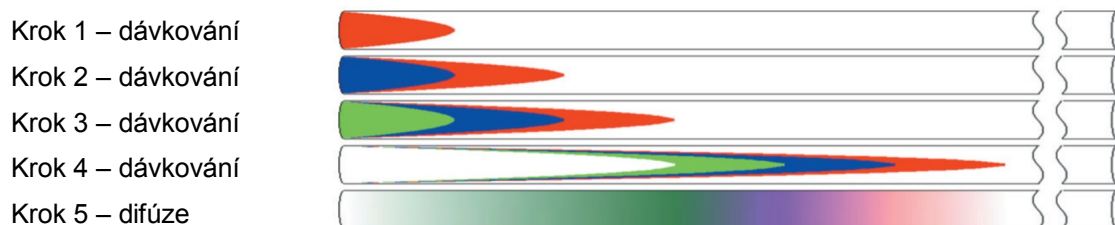
2.6 Elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza (EMMA)

Elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza, známá rovněž jako online uspořádání v CZE, je založena na rozdílných elektroforetických pohyblivostech nebo difúzi enzymů, substrátů či produktů, dle toho jaké uspořádání je preferováno. Podstatou této techniky je nadávkování jednotlivých zón složek, jež chceme, aby mezi sebou reagovaly, za sebou do separační kapiláry. Jako první zóna se do separační kapiláry naplněné základním elektrolytem nadávkuje reaktant s nižší elektroforetickou pohyblivostí, dále se dávkuje reaktant s vyšší pohyblivostí. Následně dochází k vložení separačního napětí, čímž dochází k elektroforetické migraci a tedy k promísení reaktantů díky rozdílným elektroforetickým pohyblivostem a překrytí reakčních zón. Po tomto sloučení dochází k inkubaci reakční směsi bez vložení napětí, kdy lze volit dobu průběhu enzymové reakce, následně po vložení vnějšího napětí dochází k odseparování produktů reakce a nezreagovaného substrátu. Druhou možností je vložení elektrického pole po celou dobu enzymového štěpení, kdy ihned dochází k separaci produktů a nezreagovaného substrátu [54, 55]. Na následujícím **obrázku 3** je znázorněn průběh mísení jednotlivých zón v kapiláře na základě jejich rozdílných pohyblivostí.



Obrázek 3 Schéma mísení zón v EMMA na základě rozdílných elektroforetických pohyblivostí. (E-enzym, P-produkt, S-substrát). (I) nejprve je dávkován enzym, následně substrát (II) po vložení napětí dochází k migraci reaktantů a překrytí zón. (III) po určitém časovém intervalu se zóny zcela překryjí a dochází k enzymové reakci. (IV) separační krok, kdy dochází k odseparování nezreagovaného substrátu, produktu a enzymu [55].

Promísení zón reaktantů je rovněž možné na základě difúze jednotlivých složek, kdy není nutno před inkubací vkládat separační napětí. Vhodným způsobem dávkování se stává dávkování hydrodynamické, kdy dávkovaná zóna získá parabolický tvar a při dávkování reaktantů za sebou dochází k zasouvání zón do sebe. Promísení se pak uskuteční na základě velmi rychlé příčné difúze, podélná difúze je zde zanedbatelná s ohledem k extrémnímu rozdílu v průměru kapiláry (50 μm) a délce dávkovaných zón (jednotky mm). K tomuto způsobu mísení byl navržen matematický model Transverse diffusion of laminar flow profiles (TDLFP), na jehož základě lze určit přesné pořadí složek pro co nejefektivnější promísení reaktantů [56]. Na **obrázku 4** je znázorněno promísení reaktantů za pomoci příčné difúze.



Obrázek 4 Simulace mísení zón v kapiláře na základě TDLFP. V prvních třech krocích dochází k dávkování příslušných reaktantů. Ve čtvrtém kroku je dávkován základní elektrolyt nebo voda. V pátém kroku je znázorněn výsledek příčné difúze [56].

Dále lze online metodu rozdělit na homogenní a heterogenní mód. V případě homogenního módu jsou všechny reagující látky v roztoku, naproti tomu v heterogenním uspořádání se nejprve enzym imobilizuje na vnitřním povrchu kapiláry díky vhodnému nosiči, čímž dojde k vytvoření mikroreaktoru, do něhož je následně dávkován substrát. Po vložení separačního napětí jsou produkty reakce elektroforeticky odděleny [50]. Online uspořádání se stává vhodným díky velmi malé spotřebě vzorků a snadné automatizaci. Nevýhodou však u této techniky zůstává vysoká variabilita ploch píků činidel a produktů, jež je zapříčiněna horší reprodukovatelností mísení zón [57].

2.6.1 Využití EMMA v praxi

Kapilární zónová elektroforéza jakožto analytická separační technika spojuje rychlost s vysokou účinností separace, automatizací a nízkou spotřebou vzorků a proto je tato metoda vhodná zejména jako alternativní technika pro studium enzymových reakcí. Především její uspořádání EMMA bylo shledáno jako velmi perspektivní a tento způsob provedení se stále více dostává do popředí [10, 58].

V roce 1992 byla publikována první studie o mísení reaktantů v kapiláře a metoda byla později pojmenována jako elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza (electrophoretically mediated microanalysis, EMMA). V této první studii byla zkoumána enzymová aktivita glukosa-6-fosfátu dehydrogenasy na substrátu NADP za vzniku 6-fosfoglukonátu a NADPH, který je detekovatelný při 340 nm [59, 60]. V dalších letech byla EMMA dále využívána pro nepřímé stanovení ethanolu či vápníku, kdy v prvním případě byl ethanol za pomoci alkoholdehydrogenasy přeměněn na acetaldehyd. Reakce je doprovázena redukcí NAD^+ na NADH, který je stanovitelný UV detekcí při 340 nm jako míra množství dávkovaného ethanolu [61]. V druhém případě se jednalo o nadávkování analytu s vyšší elektroforetickou pohyblivostí obsahujícího vápník za zónu *o*-kresoltalein-komplexonu, jehož pohyblivost byla nižší než pohyblivost vápníku. Po vložení elektrického napětí došlo k promísení zón a vzniku produktu, který byl unášen elektroosmotickým tokem a stanoven při 575 nm [62]. Tato technika kapilární zónové elektroforézy byla rovněž využita ke stereoselektivnímu stanovení L-methionin-sulfoxidových diastereomerů, které vznikají při štěpení (Fmoc)-L-methionin-sulfoxidu enzymem methionin-sulfoxid reduktasou. V průběhu oxidativního stresu dochází k přeměně L-methioninu na L-methionin-sulfoxid, který se v těle člověka hromadí během stárnutí a může hrát významnou roli při vzniku degenerativních onemocnění. Výsledkem studie bylo úspěšné sledování stereospecifické redukce methionin-sulfoxidu a stanovení kinetických dat pro enzym jak v online, tak offline uspořádání. Závěrem se ukázalo, že výsledky online se od offline nijak významně nelišily, avšak online metoda byla provedena v kratším časovém intervalu, byla plně automatizovaná a zahrnovala menší spotřebu vzorků [63].

Jako další názorný příklad vhodného využití EMMA pro studium enzymových aktivit je sledování kinetiky enzymu glycerolkinasy ke dvěma substrátům, a to glycerolu a adenosin-5-trifosfátu. V této studii se úspěšně povedlo smísit tři zóny reaktantů v pořadí adenosin-5-trifosfát, enzym, glycerol. Následovalo promísení na základě rozdílných

elektroforetických pohyblivostí, dále byla provedena inkubace po dobu 3 minut a v posledním kroku došlo k vložení separačního napětí, odseparování a detekování produktu adenosin-5-difosfátu při 254 nm UV detektorem [64].

Studie popisující enzymovou aktivitu cellobiasy v různých podmínkách za využití dostupných metod byly již představeny a však studie o štěpení substrátu tímto enzymem v mikroměřítku za využití EMMA či offline módu kapilární elektroforézy, nebyly dosud publikovány [3, 65, 66].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Hydroxid sodný (p.a.), fosforečnan sodný (p.a.), hydrogenfosforečnan sodný (p.a.), octan sodný (p.a.), kyselina octová (p.a., 99%) (Lachner, Neratovice, Česká republika), D-(+)-celotriosa ($\geq 93\%$), D-(+)-cellobiosa ($\geq 98\%$), D-(+)-glukosa ($\geq 99,5\%$), cellobiasa z *Aspergillus niger* (≥ 250 jednotek/g) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.1.2 Použitý software

Peakmaster 5.1 [67], OriginPro 8 SRO v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation), MS Office Excel 2007 (Microsoft), 3D-CE ChemStation rev. B. 04.02 (97) (Agilent Technologies)

3.1.3 Příprava separačních elektrolytů

Rozpuštěním potřebného množství hydroxidu sodného, fosforečnanu sodného a hydrogenfosforečnanu sodného v deionizované vodě byly připraveny následující separační elektrolyty, separační elektrolyty obsahující pouze $30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ($\text{pH} = 12,39$) a $75 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxid sodný ($\text{pH} = 12,75$), dále elektrolyty obsahující vždy $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosforečnanu sodného, $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydrogenfosforečnanu sodného a hydroxid sodný o koncentracích 10, 20, 30, 40 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kdy pH roztoků bylo postupně 11,96; 12,22; 12,38 a 12,50 (všechny uvedené hodnoty pH byly vypočteny pomocí Peakmaster 5.1).

3.1.4 Příprava roztoků a provedení enzymové reakce

Rozpuštěním celotriosy, cellobiosy a glukosy v deionizované vodě byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 10 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 15 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a 10 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, které byly používány při optimalizaci separace a při provádění enzymových reakcí. Reakce byly prováděny v prostředí acetátového pufru o $\text{pH} = 5,0$, přičemž koncentrace zásobního roztoku byla 1,4 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Pro enzymové reakce v offline uspořádání bylo připraveno 81 μl roztoku cellotriosy v acetátovém pufru, přičemž výsledná koncentrace cellotriosy v 90 μl byla $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentrace acetátového pufru byla $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, případně $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Následně bylo přidáno 9 μl roztoku cellobiasy (zředěné 500 \times), jehož konečné zředění v reakční vialce činilo 5000 \times . Enzymová reakce v offline uspořádání byla prováděna ve vialce o celkovém objemu 90 μl .

Pro automatizaci offline metody CE bylo potřeba připravit vialku s $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztokem substrátu (90 μl) v $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ acetátovém pufru a vialku s naředěným roztokem enzymu (600 μl). Zvolená ředění enzymu byla 10, 50, 100 \times .

Pro enzymové reakce v online uspořádání CE byla připravena vialka s $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztokem substrátu o celkovém objemu 90 μl , s i bez přidavku acetátového pufru, jehož konečná koncentrace byla 10 a $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Dále vialka s roztokem enzymu o objemu 90 μl , jehož konečné zředění činilo 5000 \times opět s i bez přidavku acetátového pufru o koncentracích 10 a $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a samostatná vialka s roztokem acetátového pufru (600 μl , pH = 5) o koncentracích 10 a $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

3.1.5 Přístrojové vybavení

- Zařízení pro kapilární zónovou elektroforézu model 7100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)
- Bezkontaktní vodivostní detektor (Admet, Praha, Česká republika) – tento detektor je tvořen dvěma čtyřmilimetrovými elektrodami válcového tvaru o vnitřním průměru 600 μm , jež jsou sériově umístěny kolem kapiláry, přičemž izolační mezera má velikost 1 mm. Délka přímého detekčního zařízení činí tedy celkově 9 mm. Elektrody jsou napojeny na zdroj vysokofrekvenčního napětí o frekvenci 1,84 MHz. Obvodem protéká vysokofrekvenční proud, který je závislý na odporu roztoku, jež aktuálně protéká detekčním zařízením a ten je elektronickým zařízením vyhodnocován. Pro uzemnění a zamezení přímé kapacitní vazby mezi elektrodami slouží kovový disk, jenž je umístěn mezi elektrodami. Celé zařízení je situováno do kazety, která se vkládá do zařízení pro kapilární zónovou elektroforézu.
- Separační křemenná kapilára (vnitřní průměr 20 μm , vnější průměr 375 μm , celková délka 50 cm, efektivní délka 35 cm, Polymicro Technologies, USA)

- Separační křemenná kapilára (vnitřní průměr 50 μm , vnější průměr 375 μm , celková délka 80 cm, efektivní délka 65 cm, CACO-Sila Tubing and Optical Fibers, Slovenská republika)

3.2 Popis experimentů

3.2.1 Optimalizace separace cellodextrinů

Pro separaci cellodextrinů byl nejprve využit separační elektrolyt obsahující pouze 30 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 μm a celkové délce 80 cm. Dále byl vyzkoušen pro separaci sacharidů 75 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ hydroxid sodný v separační kapiláře o vnitřním průměru 20 μm a celkové délce 50 cm. Následně byl využit separační elektrolyt obsahující 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ fosforečnanu sodného a 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ hydrogenfosforečnanu sodného s různou koncentrací hydroxidu sodného a to 10, 20, 30 a 40 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ v kapiláře o vnitřním průměru 50 μm a celkové délce 80 cm. Vložené separační napětí vždy bylo nastaveno na 30 kV, kazeta s kapilárou byla termostatována na 25 °C a způsob dávkování byl hydrodynamický 5 kPa po dobu 5 s. Promývání separační kapiláry bylo prováděno tlakem o velikosti 100 kPa.

3.2.2 Offline uspořádání

Při enzymových reakcích prováděných v offline uspořádání byl vždy nejprve připraven roztok substrátu ve vzorkové vialce, ke kterému byl přidán acetátový pufr a roztok enzymu potřebného zředění. Zvolenou hodnotu ředění je vždy nutno ověřit při práci s neznámými vzorky, neboť může docházet k detekci jejich píků, které mohou rušit stanovení požadovaných analytů. Enzymová reakce se vždy nechala určitý čas probíhat a následně bylo z té samé vialky hydrodynamicky dávkováno tlakem 5 kPa po dobu 5 s do separační kapiláry. Před každým nadávkováním bylo nutno kapiláru 3 minuty promývat separačním elektrolytem. Následně bylo vloženo napětí mezi konce kapiláry o velikosti 30 kV a došlo k odseparování nezreagovaného substrátu a vzniklých produktů enzymového štěpení.

3.2.3 Automatizace stanovení v offline uspořádání

Pro experimenty za účelem automatizovat offline metodu bylo potřeba zvlášť připravit vialku se substrátem a zvlášť vialku s enzymem daného zředění. Pouze vialka se substrátem obsahovala acetátový pufr ($\text{pH} = 5$). Separační křemenná kapilára byla nejprve promývána 2 minuty vodou a následně 2 minuty vzduchem, aby došlo k jejímu vyprázdnění. Následně byl hydrodynamicky dávkován enzym tlakem 10 kPa po dobu 10 s na výstupní konec kapiláry. Dále byla na výstupní konec umístěna vialka se substrátem, do které byl vstříknut enzym nadávkovaný v kapiláře a to tak, že došlo k promytí kapiláry vzduchem tlakem o velikosti 100 kPa po dobu 2 min, tím došlo k vytlačení enzymu ze separační kapiláry do vialky se substrátem (probublávání ve směru vstupní-výstupní konec kapiláry) a zároveň promíchání reakční směsi probubláváním vzduchem po dobu 2 min. Následně bylo spuštěno promytí separační kapiláry základním elektrolytem po dobu 3 min a poté došlo k hydrodynamickému dávkování produktů enzymové reakce (5 kPa / 5 s) z reakční vialky, vložení separačního napětí a odseparování zbylého substrátu a vzniklých produktů reakce.

3.2.4 Online uspořádání

Pro enzymové reakce prováděné v online uspořádání byla vždy připravena jedna vialka se substrátem (s i bez acetátového pufru, $\text{pH} = 5,0$), dále vialka s enzymem (s i bez acetátového pufru, $\text{pH} = 5,0$) a vialka s acetátovým pufrem ($\text{pH} = 5,0$) o zvolených koncentracích. Před započítím experimentu bylo nutno naplnit separační kapiláru základním elektrolytem, čehož bylo docíleno jejím tříminutovým promytím. Následně docházelo k hydrodynamickému dávkování jednotlivých reakčních zón v určitém pořadí. Bylo vyzkoušeno dávkování dvou až čtyř za sebou jdoucích zón substrátu, enzymu, acetátového pufru, vody nebo separačního elektrolytu. V průběhu experimentu se pořadí dávkovaných složek měnila, vyzkoušena byla i změna velikosti dávkovacího tlaku a doby.

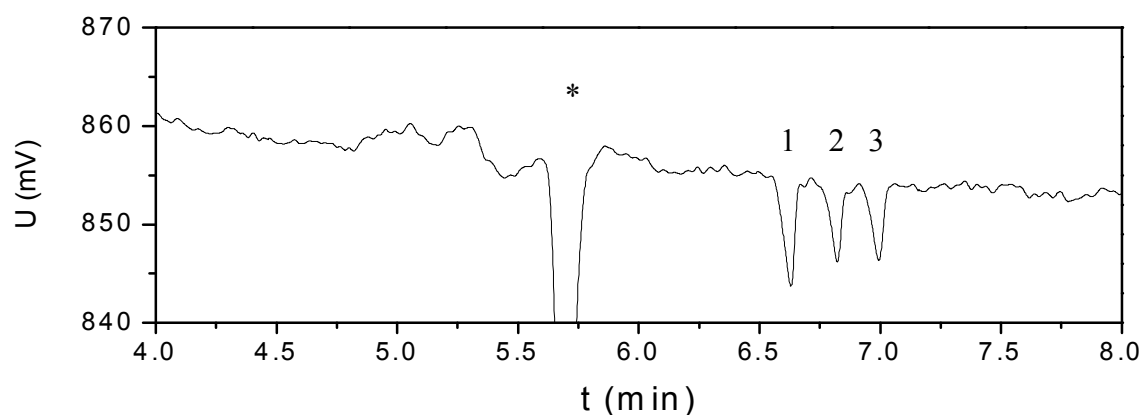
4 Výsledky a diskuze

4.1 Optimalizace složení separačního elektrolytu

Z důvodu velmi nízké absorpce elektromagnetického záření v oblasti UV/VIS dostupné v použitém přístroji nebylo možno využít pro detekci cellodextrinů přímou UV detekci. Pro stanovení sacharidů byla využita bezkontaktní vodivostní detekce, přičemž pro jejich separaci je bylo nutno ionizovat, čehož bylo docíleno využitím separačního elektrolytu o vysoké hodnotě pH. Díky vysoké hodnotě pH došlo k disociaci hydroxylových skupin, přičemž cellodextriny získaly záporný náboj a při vlastní separaci po vložení vhodného separačního napětí docházelo k jejich pohybu v elektrickém poli a následně k jejich detekci zmíněným detektorem. Na základě zvoleného druhu detektoru nebyla možná ionizace sacharidů pomocí tvorby komplexů s boritanem, neboť C^4D detektor neumožňuje tyto komplexy detekovat.

Jako separační elektrolyt byl nejprve využit roztok hydroxidu sodného v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 μm a celkové délce 80 cm (efektivní délka 65 cm). Nejprve bylo nutno nalézt optimální koncentraci a pH separačního elektrolytu, aby došlo k dostatečné disociaci hydroxylových skupin sacharidů a tím pádem k rozdílu v pohyblivostech jednotlivých cellodextrinů. Zároveň musela být zvolena hodnota pH separačního elektrolytu, která by odpovídala takové vodivosti základního elektrolytu, aby nedocházelo k saturaci signálu detektoru. Koncentrace separačního elektrolytu byla následně stanovena na 30 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného, kdy pH roztoku dosahovalo hodnoty 12,39. Při experimentech bylo vloženo maximální separační napětí, které umožnila dostupná technika a to 30 kV ($I = 52 \mu\text{A}$). Volbou zmíněné velikosti napětí došlo především ke zkrácení doby analýzy, k zaostření píků cellodextrinů a rovněž se zlepšila samotná jejich separace.

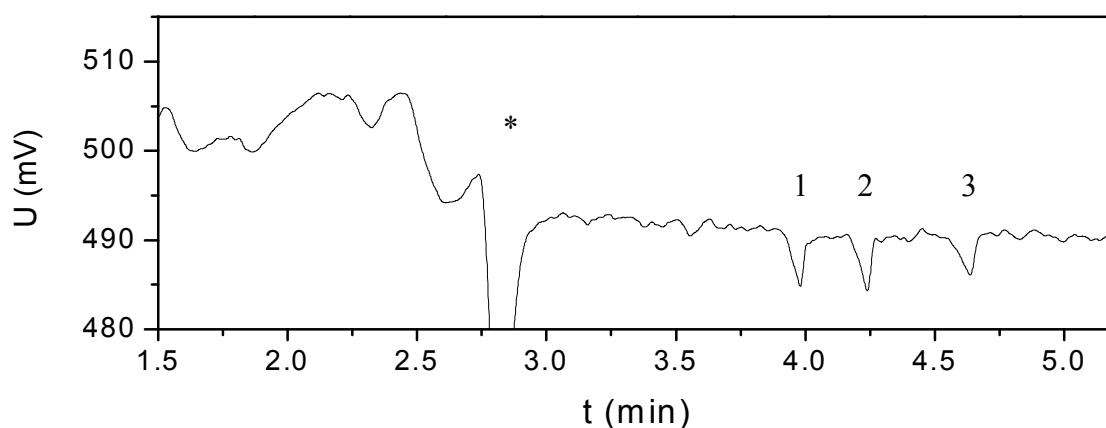
Na **obrázku 5** je znázorněn elektroferogram separace cellodextrinů, kde jsou jednotlivé sacharidy od sebe sice odseparovány, nicméně nerovnosti v základní linii znemožňují jejich přesnou kvantifikaci a dochází tak k nežádoucímu zvýšení nejistoty výsledku, meze detekce a stanovitelnosti.



Obrázek 5 Separace cellodextrinů za využití $30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného ($\text{pH} = 12,39$; $I = 52 \text{ } \mu\text{A}$). Separační kapilára $50 \text{ } \mu\text{m} \times 80 \text{ cm} / 65 \text{ cm}$. (*) EOF-voda; (1) cellotriosa; (2) cellobiosa; (3) glukosa. Koncentrace všech sacharidů $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Pro lepší kvantifikaci jednotlivých cellodextrinů byla dále vyzkoušena užší křemenná kapilára a to o vnitřním průměru $20 \text{ } \mu\text{m}$. Z důvodu menšího vnitřního průměru, kdy se doba analýzy značně prodlužuje, byla separační kapilára zkrácena na celkovou délku 50 cm (efektivní délka byla 35 cm). Tato délka postačila k vzájemnému odseparování sacharidů. Dále na základě užší separační kapiláry bylo možno použít koncentrovanější hydroxid sodný jako separační elektrolyt, neboť zde docházelo k efektivnějšímu odvodu Joulova tepla než při průměru $50 \text{ } \mu\text{m}$. Díky menšímu vnitřnímu průřezu kapiláry byl zde větší odpor a tím pádem kapilárou neprotékal tak velký proud a rovněž tak nedocházelo k saturaci signálu C^4D detektoru, ke které by došlo v případě použití koncentrovanějšího hydroxidu sodného na separaci v kapiláře o průměru $50 \text{ } \mu\text{m}$. Zvolená koncentrace hydroxidu sodného byla nakonec $75 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, přičemž pH roztok dosahovalo $12,75$ ($I = 32 \text{ } \mu\text{A}$). Mezi další výhody kapiláry s menším vnitřním průměrem patří to, že se rovněž zlepšilo rozlišení separace jednotlivých analytů, díky vyššímu pH a tím pádem větší disociaci.

Na následujícím **obrázku 6** je zobrazen efekt zlepšující se separace sacharidů, nicméně v užší kapiláře je při využití separačního elektrolytu o tak vysokém pH zesílena destabilizace základní linie, kdy detektor detekuje sebemenší změnu ve vodivosti separačního elektrolytu a dochází tak k nárůstu relativních směrodatných odchylek plochy píků.



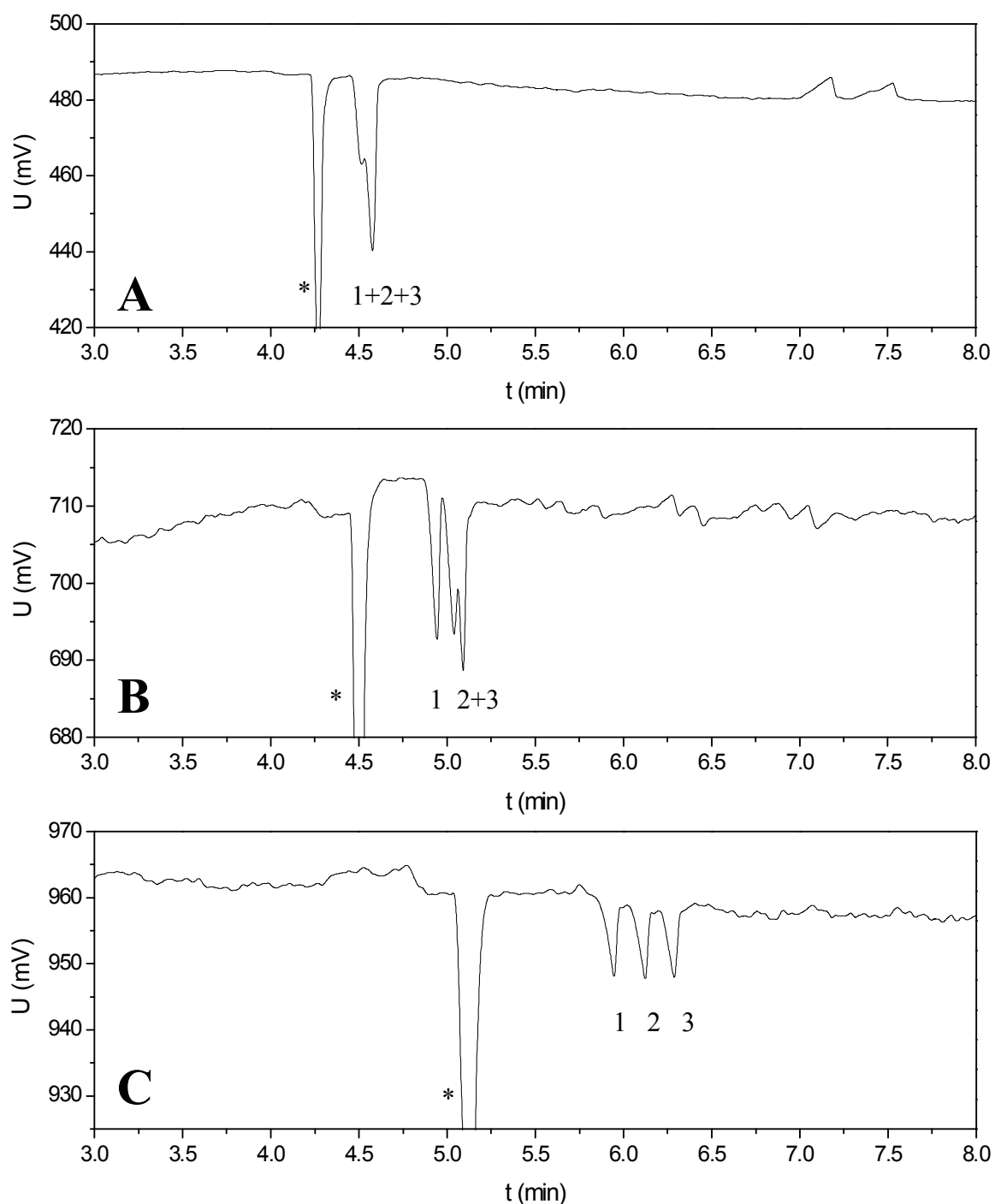
Obrázek 6 Separace cellodextrinů za využití $75 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného ($\text{pH} = 12,75$; $I = 32 \text{ } \mu\text{A}$). Separační kapilára $20 \text{ } \mu\text{m} \times 50 \text{ cm} / 35 \text{ cm}$. (*) EOF-voda; (1) cellotriosa; (2) cellobiosa; (3) glukosa. Koncentrace všech složek $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Pro další měření byla využita separační kapilára s větším vnitřním průměrem a to $50 \text{ } \mu\text{m}$ o celkové délce 80 cm , kde sice bylo nutno využívat k měření méně koncentrovaný hydroxid sodný, aby nedocházelo k saturaci signálu detektoru, ale bylo dosaženo lepší opakovatelnosti. Rovněž bylo možné zmíněnou kapiláru použít pro více experimentů než kapiláru o nižším vnitřním průměru, kde velmi často docházelo k jejímu zablokování nečistotami.

Problémy s nestabilní základní linií byly vyřešeny přidáním fosfátového pufru. Díky již příliš vysoké vodivosti hydroxidu sodného byl přidán pouze $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátový pufr. Zaznamenaná odezva detektoru se pohybovala mezi $900 - 1000 \text{ mV}$, kdy nad touto hranicí již C^4D detekce nebyla schopná registrovat signál, proto při přidání fosfátového pufru o vyšší koncentraci do roztoku hydroxidu sodného nebylo možné zaznamenat odezvu.

4.1.1 Vliv koncentrace NaOH na separaci po přidavku fosfátového pufru

Jak již bylo zmíněno, pro další měření se do separačního elektrolytu přidával vždy $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátový pufr, aby došlo ke stabilizaci základní linie pravděpodobně na základě zvýšení pufrací kapacity elektrolytu. Tímto přidavkem však docházelo ke zvýšení vodivosti elektrolytu, proto bylo nutno zjistit potřebnou koncentraci hydroxidu sodného, aby docházelo k odseparování cellodextrinů a rovněž nebyl signál detektoru přesycen.



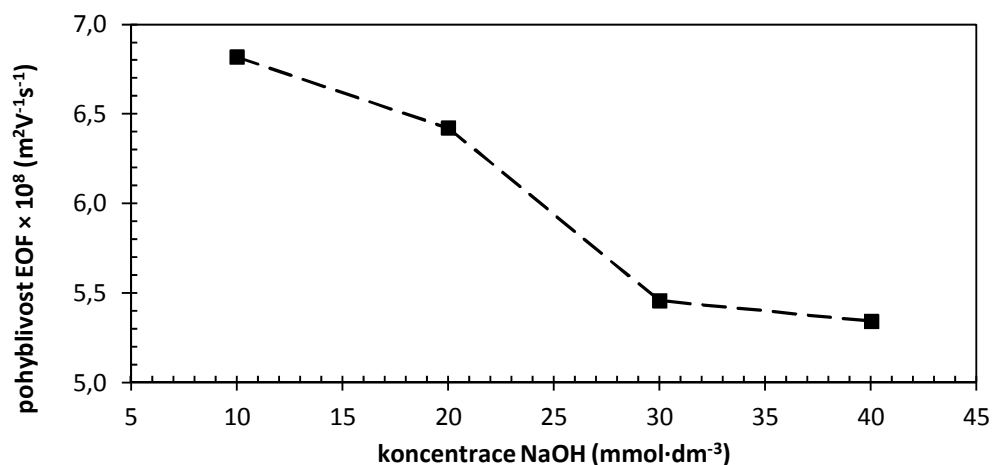
Obrázek 7 Vliv koncentrace hydroxidu sodného v $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátovém pufru na separaci sacharidů. (A) Koncentrace NaOH $c = 10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{pH} = 11,95$; (B) Koncentrace NaOH $c = 20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{pH} = 12,22$; (C) Koncentrace NaOH $c = 30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{pH} = 12,38$. Separační kapilára $50 \mu\text{m} \times 80 \text{ cm} / 65 \text{ cm}$. (*) EOF-voda ; (1) cellostriosa; (2) cellobiosa; (3) glukosa. Koncentrace všech sacharidů $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Na **obrázku 7** je vyobrazen vliv koncentrace hydroxidu sodného ve $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátovém pufru. Je zde jasně pozorovatelná postupně se zlepšující separace sacharidů

díky rostoucímu hodnotě pH separačního elektrolytu.

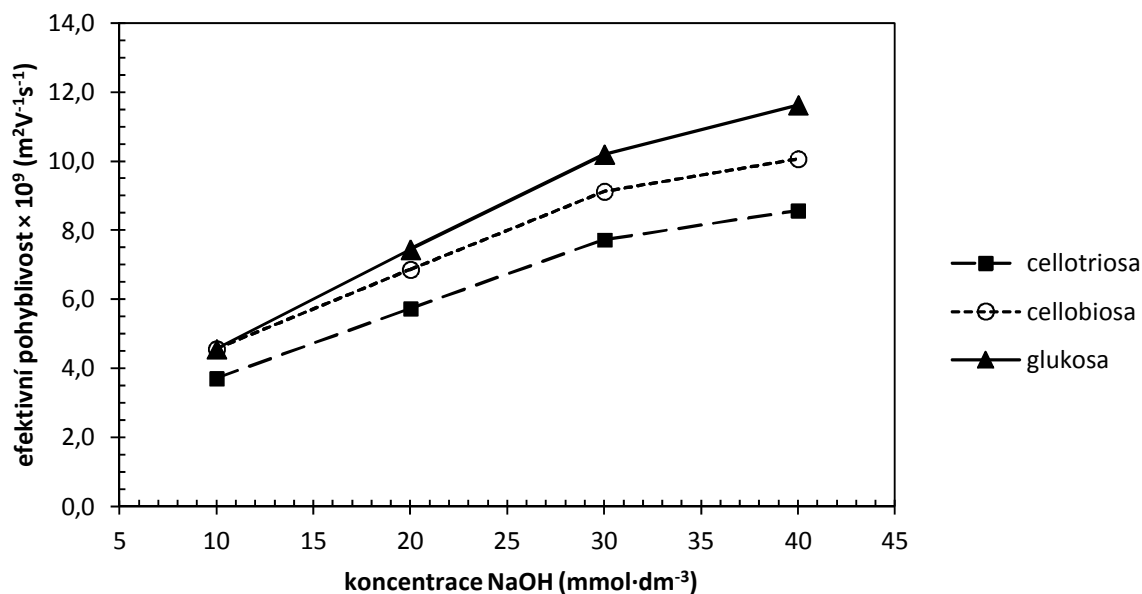
Na **obrázku 7A**, kdy koncentrace hydroxidu sodného je pouze $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 11,95$ je patrné, že separační elektrolyt nedosahuje dostatečného pH a tím pádem nedochází k odseparování celotriosy, cellobiosy a glukosy. Na dalším elektroferogramu znázorněném na **obrázku 7B**, kdy je koncentrace hydroxidu sodného již $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 12,22$, lze pozorovat odseparovanou celotriosu, nicméně rozlišení píků cellobiosy a glukosy není dostatečné na to, aby bylo možné je považovat za oddělené. Na **obrázku 7C** byla úspěšně provedena separace celodextrinů za využití hydroxidu sodného o koncentraci $30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ s přidavkem $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátového pufru ($\text{pH} = 12,38$). Celková doba analýzy nepřesahovala 7 minut a všechny analyty byly separovány na základní linii s rozlišením vyšším než 1,5 (viz **tabulka 1**). Při dalším navýšení koncentrace hydroxidu sodného na $40 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ($\text{pH} = 12,50$) bylo možné pozorovat saturaci detektoru a znemožněnou přesnou kvantifikaci separovaných sacharidů.

Na znázorněných elektroferogramech separace celodextrinů je rovněž patrný rostoucí čas analýzy se zvyšující se koncentrací hydroxidu sodného. Elektroosmotický tok se s rostoucí iontovou silou roztoku zpomaluje, neboť dochází k poklesu zeta-potenciálu a důsledkem je prodloužení doby analýzy, to lze pozorovat na **obrázku 8**, který představuje závislost pohyblivosti elektroosmotického toku na koncentraci hydroxidu sodného.



Obrázek 8 Závislost pohyblivosti EOF na koncentraci hydroxidu sodného v separačním elektrolytu. Separační kapilára $50 \mu\text{m} \times 80 \text{ cm} / 65 \text{ cm}$; separační pufr NaOH s přidavkem $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátového pufru. Separační napětí 30 kV. EOF – voda. Chybové úsečky nejsou zobrazeny, neboť směrodatné odchylky nepřesáhly řádově hodnotu $1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Zároveň také s rostoucím pH dochází vlivem postupné disociace ke zrychlení migrace sacharidů proti směru EOF. Závislost efektivní pohyblivosti jednotlivých celloextrinů na koncentraci hydroxidu sodného v separačním elektrolytu obsahujícím $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátový pufr je znázorněna na **obrázku 9**.



Obrázek 9 Závislost efektivní pohyblivosti jednotlivých celloextrinů na koncentraci hydroxidu sodného v separačním elektrolytu. Separační kapilára $50 \mu\text{m} \times 80 \text{ cm} / 65 \text{ cm}$; separační pufr NaOH s přidavkem $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátového pufru. Separační napětí 30 kV, hydrodynamické dávkování 5 kPa za 5 s. Koncentrace sacharidů $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Chybové úsečky nejsou zobrazeny, neboť směrodatné odchylky nepřesáhly řádově hodnotu $1 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Ze závislosti efektivní pohyblivosti celloextrinů na koncentraci hydroxidu sodného v separačním elektrolytu s přidavkem $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátového pufru na **obrázku 9** je patrné, že s rostoucí koncentrací dochází k nárůstu rozdílů mezi efektivními pohyblivostmi jednotlivých sacharidů a ke zvýšení rozlišení mezi píky, které je představeno v **tabulce 1**. Při koncentraci $30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného v separačním elektrolytu jsou sacharidy zcela odseparovány.

Tabulka 1 Rozlišení mezi píky jednotlivých cellodextrinů.

Rozlišení mezi píky	koncentrace NaOH ($\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$)			
	10	20	30	40
cellotriosa - cellobiosa	0,65	1,03	1,98	-
cellobiosa - glukosa	-	0,56	1,80	-

4.2 Opakovatelnost měření

Opakovatelnost měření byla testována pro cellotriosu, cellobiosu a glukosu za použití $30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného jako separačního elektrolytu bez přidavku fosfátového pufru v křemenné kapiláře o vnitřním průměru $50 \mu\text{m}$ a celkové délce 80 cm. Dále pro separační elektrolyt obsahující pouze $75 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxid sodný opět bez přidavku fosfátového pufru v kapiláře s vnitřním průměrem $20 \mu\text{m}$ a celkovou délkou 50 cm. Nakonec byla zjištěna opakovatelnost pro cellodextriny v $30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodném s přidavkem $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátového pufru v separační kapiláře o vnitřním průměru $50 \mu\text{m}$. Při všech měřeních byla koncentrace všech separovaných složek $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a každý experiment byl proveden celkem sedmkrát. V následující **tabulce 2** jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky ploch pík sacharidů pro různé složení separačního elektrolytu.

Tabulka 2 Opakovatelnost zjištěných ploch pík cellodextrinů. Koncentrace všech sacharidů $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Počet měření $n = 7$.

Separační elektrolyt	Průměr	RSD (%) ploch pík		
	kapiláry (μm)	Celotriosa	Cellobiosa	Glukosa
$30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH	50	11,74	11,88	12,45
$75 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH	20	18,21	16,14	18,13
$30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH, $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátový pufr	50	3,64	2,44	6,05

Relativní směrodatné odchylky naměřených ploch pík cellodextrinů v **tabulce 2** se pohybují v rozmezí 11,5 – 12,5 % při využití $30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného ($\text{pH} = 12,39$) jako separačního elektrolytu v separační kapiláře o vnitřním průměru $50 \mu\text{m}$ a celkové délce 80 cm (efektivní délka 65 cm). Nejnižší RSD byla zjištěna pro celotriosu a to 11,74 %, naopak nejvyšší RSD byla pro glukosu a to 12,45 %. Takto vysoké RSD pro

naměřené plochy píků sacharidů byly pravděpodobně způsobeny separačním elektrolytem bez pufracích vlastností a vysokým pH. Po změně experimentálních podmínek, separační kapilára o vnitřním průměru 20 μm a celkové délce 50 cm (efektivní délka 35 cm) a jako separační elektrolyt využit roztok 75 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného ($\text{pH} = 12,75$), došlo k nárůstu RSD ploch cellodextrinů, ty se pohybovaly v rozmezí 16,0 – 18,5 %. Nečekaný nárůst hodnot RSD pro plochy píků byl pravděpodobně způsoben použitou kapilárou, kdy sice došlo ke zlepšení rozlišení, nicméně značně klesl poměr signálu k šumu díky využití vodivějšího separačního elektrolytu. Následující krok sestával z navrácení separační kapiláry o vnitřním průměru 50 μm a využití separačního elektrolytu hydroxidu sodného o koncentraci 30 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, avšak s přidavkem 2,0 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ fosfátového pufru ($\text{pH} = 12,38$). Za těchto podmínek se relativní směrodatné odchylky ploch sacharidů pohybovaly v rozmezí 2,0 – 6,1 %, což lze přisuzovat použitému separačnímu elektrolytu a jeho pufracím vlastnostem, neboť v ostatních ohledech se podmínky měření nijak nelišily od měření s 30 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ hydroxidem sodným. V případě stanovení RSD ploch píků hraje jistě svou roli zmírnění fluktuací základní linie, která umožňuje přesnější integraci. Nejnižší hodnota RSD byla nalezena pro cellobiosu a to 2,44 %, naopak nejvyšší hodnota RSD byla naměřena pro glukosu a to 6,05 %.

Zároveň byly také zjištěny RSD migračních časů jednotlivých sacharidů, ty jsou představeny v **tabulce 3**.

Tabulka 3 Opakovatelnost zjištěných migračních časů cellodextrinů. Koncentrace všech sacharidů 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Počet měření $n = 7$.

Separační elektrolyt	Průměr kapiláry (μm)	RSD (%) migračních časů		
		Cellotriosa	Cellobiosa	Glukosa
30 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaOH	50	1,58	1,65	1,80
75 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaOH	20	0,84	0,87	0,89
30 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaOH, 2,0 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ fosfátový pufr	50	0,17	0,17	0,14

Z **tabulky 3** je patrné, že RSD migračních časů při využití separačního elektrolytu roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 30 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($\text{pH} = 12,39$) v separační kapiláře o vnitřním průměru 50 μm (80 cm / 65cm) nepřesáhly 2,0 %. Nejnižší hodnota RSD byla nalezena pro cellobiosu a to 1,65 % a nejvyšší hodnota RSD migračních časů byla 1,80 % pro glukosu. Při využití separačního elektrolytu roztok hydroxidu sodného o koncentraci

75 mmol·dm⁻³ (pH = 12,75) v kapiláře o vnitřním průměru 20 μm, došlo k poklesu RSD migračních časů, ty se pohybovaly v rozmezí 0,8 – 1,0 %. Nejvyšší hodnotu opět měl pík glukosy a to 0,89 %, nejnižší hodnota 0,84 % byla zjištěna pro cellotriosu. Po navrácení ke kapiláře o vnitřním průměru 50 μm a využití roztoku 30 mmol·dm⁻³ hydroxidu sodného s přidavkem 2,0 mmol·dm⁻³ fosfátového pufru (pH = 12,38), klesly RSD migračních časů až na 0,17 % pro cellotriosu a cellobiosu, pro glukosu dokonce až na 0,14 %.

Na základě zjištěných relativních směrodatných odchylek migračních časů a ploch píků v **tabulce 2** a **3** a na základě elektroferogramů znázorňujících nestabilní základní linii byl pro další měření již zvolen jako separační elektrolyt hydroxid sodný o koncentraci 30 mmol·dm⁻³ s přidavkem 2,0 mmol·dm⁻³ fosfátového pufru (pH = 12,38; I = 61 μA). S tímto separačním elektrolytem byly naměřeny kalibrační závislosti a zjištěny meze detekce a meze stanovitelnosti.

4.3 Kalibrační závislosti

Po optimalizaci složení separačního elektrolytu bylo dále nutno změřit kalibrační závislost ploch píků cellotriosy, cellobiosy a glukosy na jejich koncentraci. Koncentrace jednotlivých cellodextrinů byly voleny v rozmezí 0,1 – 2,5 mmol·dm⁻³, přičemž každý bod kalibrace byl změřen třikrát. V následující **tabulce 4** jsou zaznamenány parametry zjištěných kalibračních závislostí sacharidů.

Tabulka 4 Parametry kalibračních závislostí cellodextrinů (n=24). Kalibrační rozsah 0,1 – 2,5 mmol·dm⁻³. (Kr_{T-test} = 2,07)

	Cellotriosa	Cellobiosa	Glukosa
Směrnice (mV·s·l·mmol⁻¹)	53,59	44,22	30,80
Úsek (mV·s)	-4,34	-2,10	-2,92
T – test	4,01	3,04	4,58
R²	0,996	0,997	0,993

Hodnoty koeficientu determinace se pohybují kolem hodnoty 1, lze tedy tvrdit, že zjištěné závislosti jsou lineární v celém rozsahu koncentrací. Na základě provedeného T-testu byla velikost úseku u všech cellodextrinů shledána statisticky významnou, neboť hodnoty přesahovaly kritickou hodnotu 2,07, proto bylo nutno je zahrnout do dalších výpočtů koncentrací sacharidů.

4.4 Stanovení meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ)

Dalším cílem bylo stanovit meze detekce a stanovitelnosti pro jednotlivé cellodextriny, k tomu posloužila data získaná z kalibračních měření. Mez detekce, jež udává nejnížší možnou koncentraci analytu, kterou lze spolehlivě detekovat a jejíž signál významně vystupuje ze šumu základní linie, byla vypočtena jako trojnásobek podílu výšky šumu základní linie a směrnice příslušné kalibrační závislosti. Rovněž byly zjištěny meze stanovitelnosti, které představují takové koncentrace analytů, při nichž je přesnost měření dostačující pro kvantitativní stanovení analytů. Výpočet byl proveden jako desetinásobek podílu výšky šumu základní linie a směrnice dané kalibrační závislosti. V následující **tabulce 5** jsou uvedeny LOD a LOQ cellotriosy, cellobiosy a glukosy.

Tabulka 5 Meze detekce a meze stanovitelnosti cellodextrinů.

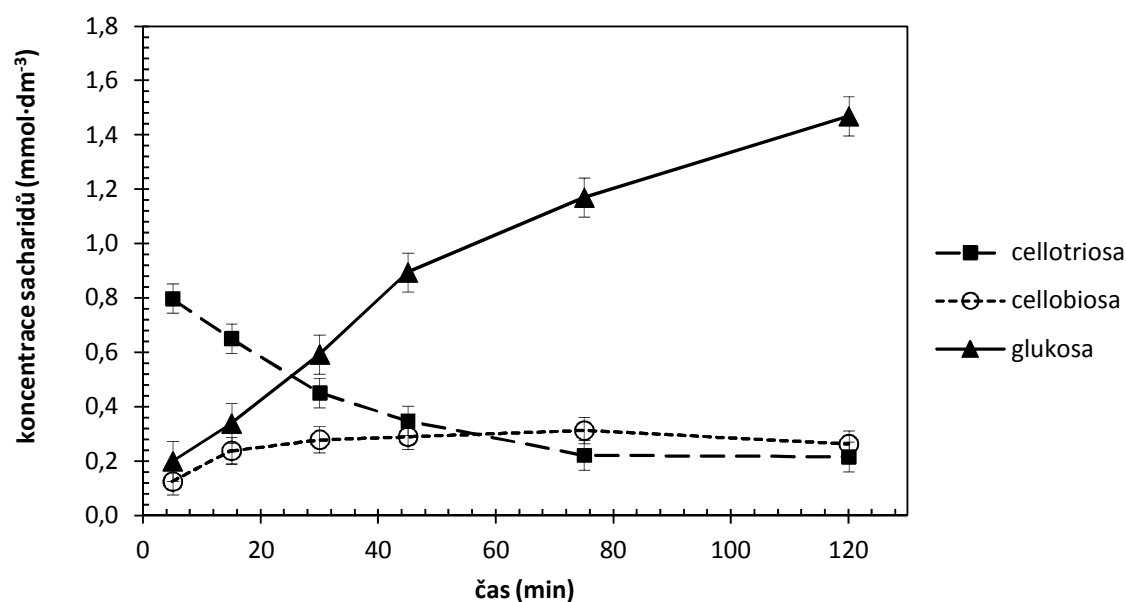
	Cellotriosa	Cellobiosa	Glukosa
LOD ($\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$)	0,020	0,023	0,026
LOQ ($\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$)	0,066	0,076	0,085

Z **tabulky 5** je patrné, že meze detekce cellodextrinů se pohybovaly v rozmezí $0,020 - 0,026 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kdy bylo možno analyty ještě spolehlivě detekovat bezkontaktním vodivostním detektorem. Meze stanovitelnosti sacharidů se pohybovaly od $0,066 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $0,085 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Při těchto koncentracích již bylo umožněno jejich kvantitativní stanovení. Z hodnot meze detekce a stanovitelnosti je patrné, že s rostoucí pohyblivostí analytu roste jeho mez detekce a stanovitelnosti. Vyšší meze detekce i stanovitelnosti pro glukosu byly pravděpodobně způsobeny tím, že glukosa má vyšší pohyblivost než ostatní cellodextriny a tím pádem má její zóna i vyšší vodivost, díky čemuž nedojde tak výraznému poklesu signálu detektoru, než tomu je u zbylých analytů.

4.5 Enzymové štěpení v offline uspořádání

Vyvinutá metoda separace cellodextrinů byla využita ke sledování enzymového štěpení cellotriosy cellobiasou v offline uspořádání. Enzymové štěpení bylo provedeno mimo separační aparaturu ve vialce s enzymem, který byl v reakční vialce celkově zředěn $5000\times$. Při tak vysokém zředění enzymu již na elektroferogramech nebyly pozorovatelné píky enzymu. Ten se v tak vysokém pH, jaké měl separační elektrolyt, nabíjel záporně

a byl pozorovatelný jako dva píky na elektroferogramu, jež zasahovaly do píků cellobiosy a glukosy. Při použití 5000× zředění enzymu, byly na elektroferogramech pozorovatelné pouze píky produktů vzniklých enzymovou hydrolyzou a pík zbylého substrátu. U experimentu se rovněž ukázala potřeba roztok substrátu okyselit a vytvořit tak optimální pH pro aktivitu enzymu, aby v reálném čase došlo k pozorovatelnému nárůstu koncentrace produktů a k jejich možnému stanovení. Enzymové štěpení zároveň komplikovala kompetitivní inhibice cellobiasy glukosou, která vznikala při enzymové hydrolyze. Po přidání acetátového pufru došlo ke zvýšení aktivity enzymu na tolik, že bylo možné pozorovat štěpení substrátu v přijatelném čase. Při experimentech se tedy následně vždy přidával k roztoku substrátu acetátový pufr o koncentracích 10 nebo 20 mmol·dm⁻³ (pH = 5). Následující graf na **obrázku 10** představuje závislosti koncentrace substrátu a produktů na čase při enzymovém štěpení v offline uspořádání za přítomnosti acetátového pufru o koncentraci 20 mmol·dm⁻³.



Obrázek 10 Enzymové štěpení cellotriasy v 20 mmol·dm⁻³ acetátovém pufru. Separační kapilára 50 µm × 80 cm / 65 cm; separační pufr 30 mmol·dm⁻³ NaOH s přidavkem 2,0 mmol·dm⁻³ fosfátového pufru (pH = 12,38). Počáteční koncentrace substrátu 1,0 mmol·dm⁻³ v 10 mmol·dm⁻³ acetátovém pufru, konečné zředění enzymu 5000×.

Vzhledem k tomu, že kalibrační závislosti byly naměřeny bez přidavku acetátového pufru, bylo nutno zjistit, zda přidané množství acetátového pufru neovlivňuje signály sacharidů a linearitu. Testovány byly koncentrace 1,0 a 2,5 mmol·dm⁻³ pro všechny sacharidy, přičemž měření byla vždy prováděna třikrát. Jako statistický test byl využit

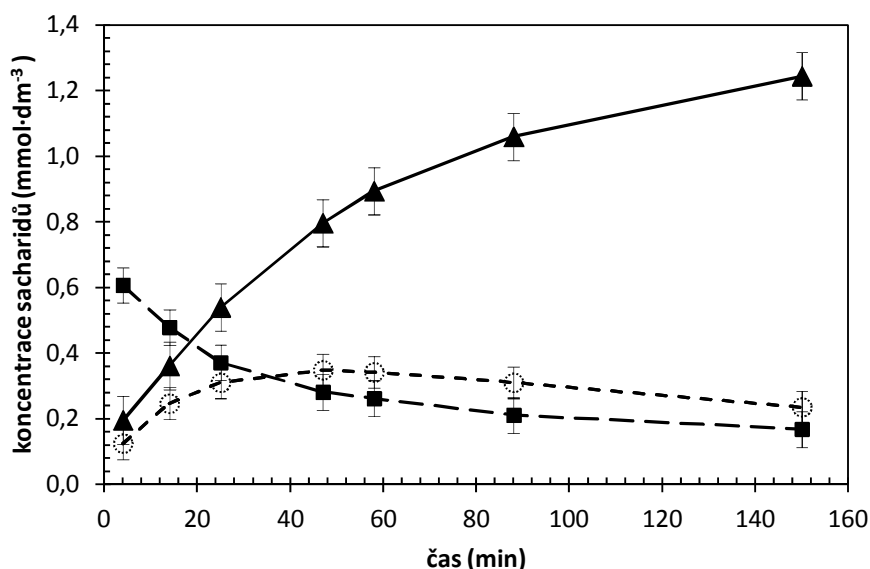
Lordův test, kde kritická hodnota, jež nesměla být přesažena, aby byla potvrzena shodnost souborů dat získaných analýzou vzorku s a bez přítomnosti acetátového pufru, byla 0,636 ($\alpha = 0,05$). Kritická hodnota pro tři měření nebyla pro žádný analyt překročena. V následující **tabulce 6** jsou uvedeny výsledky Lordova testu pro cellodextriny pro dvě již zmíněné koncentrace.

Tabulka 6 Výsledky Lordova testu pro přidavek acetátového pufru o koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. ($K_{r\text{Lordův test}}(3) = 0,636$)

Koncentrace ($\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$)	Cellotriosa	Cellobiosa	Glukosa
1,0	0,13	0,57	0,46
2,5	0,05	0,48	0,06

Potvrdilo se, že přidavek acetátového pufru o koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, neovlivňuje signál analytů a na základě toho lze soudit, že přidavek acetátového pufru o nižší koncentraci rovněž nebude ovlivňovat odezvu detektoru.

Enzymové štěpení cellotriosy cellobiasou v offline uspořádání s přidavkem $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ acetátového pufru je vyobrazen na **obrázku 11**. Acetátový pufr o nižší koncentraci byl k substrátu přidáván proto, aby byl potlačen šum základní linie, který by značně komplikoval kvantitativní stanovení analytů při dalších experimentech.



Obrázek 11 Enzymové štěpení cellotriosy v $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ acetátovém pufru. Separační kapilára $50 \mu\text{m} \times 80 \text{ cm} / 65 \text{ cm}$; separační pufr $30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH s přidavkem $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátového pufru ($\text{pH} = 12,38$). Počáteční koncentrace substrátu $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ acetátovém pufru, konečné zředění enzymu $5000\times$.

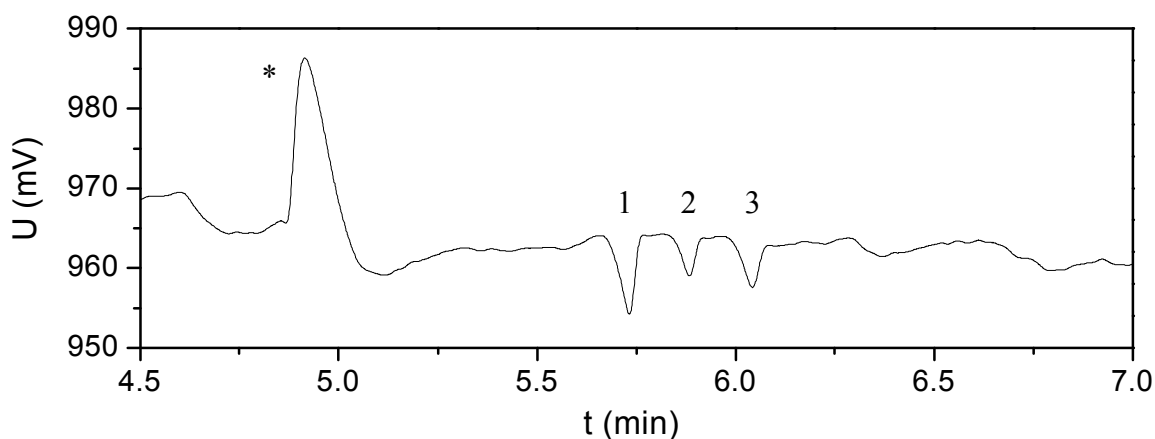
Porovnáním závislosti koncentrace substrátu a produktů štěpení na čase v 10 a 20 mmol·dm⁻³ acetátovém pufru na **obrázku 10 a 11** je patrné, že enzym je více aktivní v prostředí o vyšší iontové síle, nicméně pro štěpení v online uspořádání byla využita varianta s 10 mmol·dm⁻³ acetátovým pufrem, neboť při mísení reaktantů v kapiláře docházelo k menším fluktuacím základní linie a zlepšení kvantifikace.

4.6 Automatizace enzymového štěpení v offline uspořádání

Po úspěšném uskutečnění enzymového štěpení cellotriosy enzymem cellobiasou v offline uspořádání následovala snaha automatizovat mísení enzymu a substrátu tak, aby obsluha přístroje připravila pouze vialku obsahující roztok substrátu a vialku obsahující roztok enzymu a zbylé operace mohly být prováděny automaticky přístrojem. Cílem automatizace bylo zpřesnit dobu enzymové reakce a eliminovat vznik možných nežádoucích chyb personálu. Nejprve bylo nutno zjistit, jak koncentrovaný enzym je možné dávkovat do vialky se substrátem, aby po reakční době nebyl pozorovatelný na elektroferogramu a neznemožňoval tak kvantifikaci produktů štěpení. Experimenty byly prováděny s enzymem ředěným 10, 50, 100×. Optimální se ukázalo ředění 100×, na ostatních elektroferogramem o nižším zředění byly patrné píky příslušející cellobiase. Při vyšším zředění byla aktivita enzymu prakticky nepozorovatelná. K experimentu bylo přistoupeno tak, že nejprve musela být separační kapilára promyta vodou a následně vzduchem, aby došlo k jejímu vyprázdnění. Dále do výstupního konce kapiláry byl dávkován enzym, následně byla na výstupní konec nasazena vialka se substrátem a bylo puštěno promývání kapiláry vzduchem, což mělo za následek jednak vytlačení enzymu do vialky se substrátem a jednak probublávání roztoku, díky němuž tak došlo k promíchání reakčních složek ve vialce.

Na základě popsaného experimentu byla změřena opakovatelnost enzymového štěpení po 30 minutách reakce. Relativní směrodatné odchylky koncentrací substrátu a produktů enzymového štěpení cellotriosy enzymem cellobiasou po 30 minutách reakce dosahovaly max. 13 %. Nejvyšší hodnota RSD byla zjištěna pro cellotriosu a to 12,80 %, dále pro glukosu 12,09 % a nejnižší zjištěna hodnota RSD byla pro cellobiosu, 2,89 %. Poměrně vysoké odchylky pro cellotriosu a glukosu byly pravděpodobně způsobeny nedokonalým promísením složek. Výrazně nižší odchylka pro cellobiosu je dána tím, že štěpení cellobiosy je rychlejší než štěpení cellotriosy. Dochází tedy ke vzniku relativně nízké koncentrace cellobiosy jako meziprojektu, která se v průběhu reakce příliš nemění.

Ačkoliv stanovení absolutní rychlosti reakce by tímto způsobem nebylo příliš přesné, je tato metoda dobře použitelná pro semi-quantitativní stanovení. Zda vzorek vykazuje cellobiasovou aktivitu nebo ne. Na **obrázku 12** je znázorněno štěpení cellotriosy enzymem cellobiasou při automatickém dávkování enzymu.



Obrázek 12 Automatizované enzymové štěpení v offline uspořádání. Separační kapilára $50\ \mu\text{m} \times 80\ \text{cm} / 65\ \text{cm}$; separační pufr $30\ \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH s přidavkem $2,0\ \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátového pufru ($\text{pH} = 12,38$). Počáteční koncentrace substrátu $1,0\ \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v $10\ \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ acetátovém pufru, používané zředění enzymu $100\times$. Doba hydrolýzy 30 minut. (*) EOF – acetátový pufr; (1) cellotriosa, (2) cellobiosa; (3) glukosa.

4.7 Enzymové štěpení v online uspořádání

Po úspěšném enzymovém štěpení cellotriosy enzymem cellobiasou v offline uspořádání bylo přistoupeno ke štěpení substrátu enzymem v křemenné separační kapiláře, která byla využita jako mikroreaktor. Záměrem bylo nadávkovat za sebou zóny roztoků obsahujících enzym a substrát, k jejichž reakci mělo dojít po jejich promísení díky difúzi. Separační kapilára musela být nejprve naplněna základním elektrolytem, čehož bylo docíleno třiminutovým promýváním. Následně docházelo k hydrodynamickému dávkování jednotlivých zón reagujících složek a složek podporujících enzymovou hydrolýzu. Celkem bylo vyzkoušeno dávkování dvou až čtyř zón, které byly voleny různě dlouhé díky změně času od 2 s do 10 s či tlaku dávkování od 5 kPa do 10 kPa.

V prvním kroku této části experimentu nejprve docházelo k dávkování pouze dvou zón do separační kapiláry naplněné základním elektrolytem. První zónou byl substrát o koncentraci $1,0\ \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v acetátovém pufru o koncentraci $20\ \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ($\text{pH} = 5$).

Druhou dávkovanou zónou byl roztok enzymu zředěného $5000\times$ rovněž připraveného v $20\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ acetátovém pufru. Reakce se zpočátku nechala 15 minut probíhat, přičemž tento čas byl zvolen na základě enzymového štěpení v offline uspořádání, kdy po uplynutí této doby by měly být jasně pozorovatelné produkty štěpení. Všechny zóny byly dákovány tlakem 5 kPa po dobu 5 s. Po vložení separačního napětí byly na elektroferogramu pozorovatelné pouze výrazné fluktuace základní linie, které byly způsobeny příliš vysokou koncentrací acetátového pufru. V další části experimentu došlo tedy ke snížení koncentrace acetátového pufru z $20\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ na $10\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Všechny ostatní podmínky zůstaly nezměněné. Změnou koncentrace acetátového pufru došlo k poklesu výskytu nerovností v základní linii, nicméně nedošlo k detekci produktů enzymového štěpení, na elektroferogramu byl patrný pouze pík substrátu. Jako další krok bylo zaměřeno pořadí dákování enzymu a substrátu, což výsledek na elektroferogramu nezměnilo. V důsledku podezření na difúzi separačního elektrolytu, kterým byla křemenná kapilára naplněna, do reakční zóny a předčasné ukončení enzymové reakce, bylo přistoupeno k dákování další zóny a to acetátového pufru, ten byl dákován před případně i za reagující složky. Doba dákování této zóny se pohybovala v rozmezí 1-10 s, nicméně s ohledem na výsledky byly voleny spíše kratší doby dákování všech zón, aby celková reakční zóna nebyla příliš dlouhá a nedocházelo, tak k rozmývání potenciálních píků substrátu a produktů reakce. Přes všechny možné varianty pořadí jednotlivých reakčních zón, či přidavek zón podporujících enzymové štěpení nebylo možné uskutečnit štěpení celotriosy enzymem cellobiasou v online uspořádání kapilární zónové elektroforézy. Pravděpodobnou příčinou byla difúze hydroxidových iontů ze separačního elektrolytu do reakční zóny, které nebylo možno zamezit ani přidavkem dalších zón před nebo za reakční zónu. Vysoká hodnota pH základního elektrolytu, jež byla potřebná pro separaci jednotlivých celloextrinů, neumožnila průběh enzymové reakce, pro kterou je pH optimum kolem hodnoty 5. S největší pravděpodobností docházelo v kapiláře ke snížení aktivity enzymu natolik, že podmínky neumožnily enzymovou reakci, v úvahu také připadá možná degradace enzymu v důsledku vysokého pH separačního elektrolytu.

5 Závěr

V rámci této diplomové práce byla vyvinuta a optimalizována elektroforetická metoda pro separaci cellodextrinů, konkrétně cellotriosy, cellobiosy a glukosy. Jako ideální separační elektrolyt se ukázal $30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxid sodný s přidavkem fosfátového pufru o koncentraci $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ($\text{pH} = 12,38$). Experimenty ukázaly, že přítomnost i malého množství pufrujícího fosfátu má výrazný pozitivní vliv na výsledek analýzy, zvyšuje stabilitu základní linie a opakovatelnost měření. Následně byla testována opakovatelnost měření, přičemž pro toto složení separačního elektrolytu se relativní směrodatné odchylky ploch píků pohybovaly mezi 2,4 - 6,1 %, opakovatelnost plochy píků byla tedy uspokojivá. Co se týká relativních směrodatných odchylek migračních časů sacharidů, ty nepřesáhly hodnotu 0,2 %, což značí excelentní opakovatelnost. Po zjištění relativních směrodatných odchylek ploch píků a migračních časů bylo přistoupeno k naměření kalibračních závislostí. Průběh těchto závislostí byl vystižen lineární regresí, což potvrzují hodnoty koeficientu determinace, jež se blížily jedné.

Dále byly pro jednotlivé cellodextriny stanoveny meze detekce a meze stanovitelnosti. Mez detekce cellodextrinů se pohybovaly v rozmezí $0,020 - 0,026 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a mez stanovitelnosti sacharidů byla od $0,066 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $0,085 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Dalším krokem experimentu bylo přistoupení k enzymovým reakcím v offline uspořádání CE. Jako substrát zde vystupovala $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ cellotriosy v 10 a $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ acetátovém pufru a použitý enzym (cellobiasa) byl ředěn 5000×. Přídavek acetátového pufru bylo nutno použít z důvodu podpory enzymového štěpení, proto bylo nutno provést Lordův test, zda nedochází k ovlivnění signálů analytů a linearitě kalibračních závislostí přidavkem acetátového pufru. Výsledky testu nepřesáhly kritickou hodnotu, tedy nedocházelo k žádnému zkreslení odezvy. Porovnáním grafů závislostí koncentrace vznikajících produktů na čase v 10 a $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ acetátovém pufru, se ukázalo, že cellobiasa je více aktivní v prostředí, kde byla koncentrace acetátového pufru rovna $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, nicméně pro další experimenty byly používány roztoky substrátu v $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ acetátovém pufru, neboť zde docházelo k menšímu výskytu fluktuací v základní linii a tím pádem k lepší kvantifikaci jednotlivých sacharidů.

Dalším krokem byla snaha automatizovat offline metodu, kdy do vialky se substrátem byl pomocí přístroje dávkován enzym. Pro tento postup se ukázalo jako ideální zředění enzymu 100×. Následně byla zjišťována opakovatelnost měření enzymové reakce po

30 minutách průběhu. Hodnoty RSD automatizované offline metody pro koncentrace celotriosy a glukosy se pohybovaly max. do 13,0 %, pro cellobiosu byly hodnoty RSD do 3,0 %. Vysoké relativní směrodatné odchylky byly pravděpodobně způsobeny nedostatečným promícháním reagujících složek, proto metodu automatizovaného offline štěpení nelze využít k přesnému stanovení absolutní rychlosti enzymové reakce, nicméně se metoda ukázala vhodná pro semi-kvitativní stanovení aktivity enzymu k substrátu.

Poslední část experimentu sestávala z enzymové hydrolýzy v online uspořádání, kdy docházelo k dávkování jednotlivých zón do separační kapiláry, kde se měla uskutečnit enzymová reakce po difúzním smísení zón reaktantů. Počet vyzkoušených dávkovaných zón byl až čtyři, přičemž se obměňovalo pořadí reagujících složek a složek podporujících enzymovou reakci. Všechny možné kombinace se ukázaly jako neefektivní, což bylo pravděpodobně způsobeno difúzí hydroxidových iontů separačního elektrolytu do reakční zóny v kapiláře. Separační elektrolyt, jehož pH nevyhovovalo enzymové reakci, pravděpodobně snížil aktivitu enzymu natolik, že znemožnil průběh enzymové reakce. Přestože byla provedena řada pokusů o uskutečnění enzymových reakcí v online uspořádání, nelze toto uspořádání aplikovat na substráty, cellodextriny, a enzym cellobiasu pro její nízkou aktivitu a specifické podmínky enzymové reakce.

6 Použité zdroje

- [1] Jonathan M. Galazka, Jamie H. D. Cate: *Improving the bioconversion of plant biomass to biofuels: A multidisciplinary approach*. Energy Environ. Sci. 4 (2011): 3329
- [2] Ankit Bansal, Prabodh Illukpitiya, Surendra P. Singh, Fisseha Tegegne: *Economic competitiveness of ethanol production from cellulosic feedstock in Tennessee*. Renewable Energy 59 (2013): 53-57
- [3] Sudipto Dasa, David Berke-Schlessela, Hai-Feng Ji, John McDonough, Yen Wei: *Enzymatic hydrolysis of biomass with recyclable use of cellobiase enzyme immobilized in sol-gel routed mesoporous silica*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 70 (2011): 9-54
- [4] M. Mandels, J. Kostick, R. Parizek: *Use of adsorbed cellulase in continuous conversion of cellulose to glucose*. Journal of Polymer Science Part C-Polymer Symposium 36 (1971): 445-&
- [5] Jane Lindedam, Mai Østergaard Haven, Piotr Chylenski, Henning Jørgensen, Claus Felby: *Recycling cellulases for cellulosic ethanol production at industrial relevant conditions: Potential and temperature dependency at high solid processes*. Bioresource Technology 148 (2013): 180-188
- [6] Edward S. Castle: *The Structure of the Cell Walls of Aspergillus and the Theory of Cellulose Particles*. American Journal of Botany 32 (1945): 148-151
- [7] Seong H. Kim, Christopher M. Lee, Kabindra Kafle: *Characterization of crystalline cellulose in biomass: Basic principles, applications, and limitations of XRD, NMR, IR, Raman, and SFG*. Korean J. Chem. Eng. 30 (2013): 2127-2141
- [8] Ramendra Kishor Pal, Saikat Chakraborty: *A novel mixing strategy for maximizing yields of glucose and reducing sugar in enzymatic hydrolysis of cellulose*. Bioresource Technology 148 (2013): 611-614

- [9] Shakuntala Ghorai, Sudeshna Chowdhury, Swagata Pal, Samudra Prosad Banik, Sumana Mukherjee, Suman Khawala: *Enhanced activity and stability of cellobiase (β -glucosidase: EC 3.2.1.21) produced in the presence of 2-deoxy-D-glucose from the fungus *Termitomyces clypeatus**. Carbohydrate Research 345 (2010): 1015–1022
- [10] Tomáš Křížek, Anna Kubičková: *Microscale separation methods for enzyme kinetics assay*. Anal Bioanal Chem 403 (2012): 2185–2195
- [11] I. V. Solovyeva, V. M. Ananjin, A. V. Boev, O. N. Okunev: *The controlled biosynthesis of cellobiase by *Aspergillus* fungi*. Process Biochemistry 32 (1997): 21–28
- [12] Mohamed A. Abdel-Naby, Mona Y. Osman, Ahmed F. Abdel-Fattah: *Purification and Properties of Three Cellobiases from *Aspergillus niger* A20*. Applied Biochemistry and Biotechnology 76 (1999): 33–44
- [13] Calsavara, De Moraes, Zanin: *Comparison of Catalytic Properties of Free and Immobilized Cellobiase Novozym 188*. Applied Biochemistry and Biotechnology 91 (2001): 615–626
- [14] Robert F. H. Dekker: *Kinetic, Inhibition, and Stability Properties of a Commercial β -D-Glucosidase (Cellobiase) Preparation from *Aspergillus niger* and Its Suitability in the Hydrolysis of Lignocellulose*. Biotechnology and Bioengineering 28 (1986): 1438–1442
- [15] D. Schomburg: Brenda - The comprehensive enzyme information system. Dostupné z URL <www.brenda-enzymes.org/> [cit. 8. 1. 2014]
- [16] Roy L. Whistler, Donald. F. Durso: *Chromatographic Separation of Sugars on Charcoal*. Journal of American Chemical Society 72 (1950): 677–679
- [17] A. B. Foster: *Ionophoresis of Some Disaccharides*. J. Chem. Soc. (1953): 982–986
- [18] M. Abdelakher, F. Smith: *The detection of carbohydrate esters and lactons after separation by paper chromatography*. Journal of american chemical society 73 (1951): 5859–5860

- [19] S. A. Barker, E. J. Bourne, A. B. Foster, R. B. Ward: *Separations of Carbohydrates on Charcoal Columns in the Presence of Molybdate*. *Nature* 179 (1957): 262-263
- [20] Barth, Timell: *Separation of carbohydrates on cocoanut charcoal columns*. *Canadian Journal of Chemistry* 36 (1958): 1321-1322
- [21] R. Bentley, Nc. Saha. Cc. Sweeley: *Separation of protium and deuterium forms of carbohydrates by gas chromatography*. *Anal. Chem.* 37 (1965): 1118-&
- [22] W. Voefter, H. Bauer: *Separation of Synthetic Mixtures of Sugars and of Sugars in Body Fluids with a High-Resolution Carbohydrate Analyzer*. *Clinical Chemistry* 21 (1975): 1882-1886
- [23] Scott Hughes, Dennis C. Johnson: *High-Performance Liquid Chromatographic Separation with Triple-Pulse Amperometric Detection of Carbohydrates in Beverages*. *J. Agric. food Chem.* 30 (1982): 712-714
- [24] T. Kinoshita, Y. Kamitani, J. Yoshida, T. Urano, N. Nimura, T. Hanai: *Ultramicro Analysis of Reducing and Non-Reducing Sugars by Liquid Chromatography*. *Journal of Liquid Chromatography* 14 (1991): 1928-1938
- [25] J. Liu, O. Shiota, D. Wiesler, M. Novotný: *Ultrasensitive fluorometric detection of carbohydrates as derivatives in mixtures separated by capillary electrophoresis*. *Biochemistry* 88 (1991): 2302-2306
- [26] Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, T. P. E. M.: *High-performance zone electrophoresis*. *Journal of Chromatography* 169 (1979) : 11-20
- [27] Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, T. P. E. M.: *Concentration distributions in free zone electrophoresis*. *Journal of Chromatography* 169 (1979): 1-10

- [28] James W. Jorgenson, Kryn DeArman Lukacs: *Free-Zone Electrophoresis in Glass-Capillaries*. CLIN. CHEM. 27/9 (1981): 1551-1553
- [29] Susumu Honda, Kenji Suzuki, Kazuaki Kakehi: *Simultaneous determination of iodate and periodate by capillary zone electrophoresis: Application to carbohydrate analysis*. Analytical Biochemistry 177 (1989): 62-66
- [30] P. J. Oefner, A. E. Vorndran, E. Grill, C. Huber, G. K. Bonn: *Capillary zone electrophoretic analysis of carbohydrates by direct and indirect UV detection*. Chromatographia 34 (1992): 308-316
- [31] Beckman Colter: *Introduction to capillary electrophoresis*.
- [32] Heide R. Rabanes, Armando M. Guidote Jr., Joselito P. Quirino: *Capillary electrophoresis of natural products: Highlights of the last five years (2006–2010)*. Electrophoresis 33 (2012): 180–195
- [33] František Opekar, Karel Štulík: *Elektrochemická detekce s elektrodami mimo roztok – znovuzrození bezkontaktních impedančních metod*. Chem. Listy 104 (2010): 1148–1154
- [34] Petr Tůma, Eva Samcová, Karel Štulík: *Contactless Conductivity Detection in Capillary Electrophoresis: Employing Capillaries with Very Low Inner Diameters*. Electroanalysis 23 (2011): 1870-1874
- [35] Petr Tůma, Klára Málková, Eva Samcová, Karel Štulík: *Rapid monitoring of mono- and disaccharides in drinks, foodstuffs and foodstuff additives by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*. Analytica Chimica Acta 698 (2011): 1– 5
- [36] E. M. Abad-Villar, P. Kubáň, P.C. Hauser: *Determination of biochemical species on electrophoresis chips with an external contactless conductivity detector*. Electrophoresis 26 (2005): 3609-3614

- [37] E. Baltussen, R. M. Guijt, G. van der Steen, F. Laugere, S. Baltussen, G. W. K. van Dedem: *Considerations on contactless conductivity detection in capillary electrophoresis*. Electrophoresis 23 (2002): 2888-2893
- [38] E. M. Abad-Villar, J. Tanyanyiwa, M. T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, P. C. Hauser: *Detection of Human Immunoglobulin in Microchip and Conventional Capillary Electrophoresis with Contactless Conductivity Measurements*. Anal. Chem. 76 (2004): 1282-1288
- [39] Qi Jin Wan, P. Kubáň, J. Tanyanyiwa, A. Rainelli, P. C. Hauser: *Determination of major inorganic ions in blood serum and urine by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*. Anal. Chim. Acta 525 (2004): 11-16
- [40] J. A. F. da Silva, N. L. Ricelli, A. Z. Carvalho, C. L. do Lago: *Improved Separation of IA and IIA Metal Cations in Matrices with High Sodium Concentration by Capillary Electrophoresis with Contactless Conductometric Detection*. J. Braz. Chem. Soc. 14 (2003): 265-268
- [41] Aiping Schuchert-Shi, Pavel Kubáň, Peter C. Hauser: *Monitoring of enzymatic reactions using conventional and on-chip capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*. Electrophoresis 28 (2007): 4690–4696
- [42] Andreas J. Zemmann, Erhard Schnell, Dietmar Volgger, Günther K. Bonn: *Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis*. Anal. Chem. 70 (1998): 563-567
- [43] Radim Knob, Jan Petr, Juraj Ševčík, Vítězslav Maier: *Enantioseparation of tartaric acid by ligand-exchange capillary electrophoresis using contactless conductivity detection*. J. Sep. Sci. 36 (2013): 3426–3431
- [44] Reine Nehmé, Hala Nehmé, Grégory Roux, Deimante Cerniauskaite, Philippe Morin, Patrick Rollin, Arnaud Tatibouët: *Contactless conductivity detection for screening myrosinase substrates by capillary electrophoresis*. Analytica Chimica Acta 807 (2014): 153-158

- [45] T. Duc Mai, P.C. Hauser: *Contactless Conductivity Detection for Electrophoretic Microseparation Techniques*. The Chemical Record 12 (2011): 106-113
- [46] Ziad El Rassi, Yehia Mechref: *Recent advances in capillary electrophoresis of carbohydrates*. Electrophoresis 17 (1996): 275-301
- [47] S. Hoffstetter-Kuhn, A. Paulus, E. Gassmann, H. M. Widmer: *Influence of Borate Complexation on the Electrophoretic Behavior of Carbohydrates in Capillary Electrophoresis*. Anal. Chem. 63 (1991): 1541-1547
- [48] Stella Rovio, Jari Yli-Kauhaluoma, Heli Sirén: *Determination of neutral carbohydrates by CZE with direct UV detection*. Electrophoresis 28 (2007): 3129–3135
- [49] Alexandre Zatkovskis Carvalho, José A. F. da Silva, Claudimir L. do Lago: *Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*. Electrophoresis 24 (2003): 2138–2143
- [50] Yi Fan, Gerhard K.E. Scriba: *Advances in-capillary electrophoretic enzyme assays*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 53 (2010): 1076–1090
- [51] M. J. Perron, M. Pagé: *Measurement of the enzymatic specificity of carboxypeptidase A by capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatography A 662 (1994): 383-388
- [52] Asa Emmer, Johan Roeraade: *Capillary electrophoresis, combined with an on-line micro post-column enzyme assay*. Journal of Chromatography A 662 (1994): 375-381
- [53] Aiping Schuchert-Shi, Peter C. Hauser: *Peptic and tryptic digestion of peptides and proteins monitored by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*. Analytical Biochemistry 387 (2009): 202–207
- [54] Fred E. Regnier , Dale H. Patterson, Bryan J. Harmon: *Electrophoretically-mediated microanalysis (EMMA)*. Trends in analytical chemistry 14 (1995): 177-181

- [55] S. Nováková, S. Van Dyck, A. Van Schepdael, J. Hoogmartens, Z. Glatz: *Electrophoretically mediated microanalysis*. Journal of Chromatography A 1032 (2004): 173–184
- [56] Svetlana M. Krylova, Victor Okhonin, Sergey N. Krylov: *Transverse diffusion of laminar flow profiles – a generic method for mixing reactants in capillary microreactor*. J. Sep. Sci. 32 (2009): 742 – 756
- [57] Yolanda Martín-Biosca, Lucia Asensi-Bernardi, Rosa M. Villanueva-Camañas, Salvador Sagrado, Maria J. Medina-Hernández: *Screening of acetylcholinesterase inhibitors by CE after enzymatic reaction at capillary inlet*. J. Sep. Sci. 32 (2009): 1748–1756
- [58] Hala Nehmé, Reine Nehmé, Pierre Lafite, Sylvain Routier, Philippe Morin: *In-capillary reactant mixing for monitoring glycerol kinase kinetics by CE*. J. Sep. Sci. 36 (2013): 2151–2157
- [59] Bryan J. Harmon, Dale H. Patterson, Fred E. Regnier: *Mathematical Treatment of Electrophoretically Mediated Microanalysis*. Anal. Chem. 65 (1999): 2655-2662
- [60] Jianmin Bao, Fred E. Regnier: *Ultramicro enzyme assays in a capillary electrophoretic system*. Journal of Chromatography A 608 (1992): 217-224
- [61] Bryan J. Harmon, Dale H. Patterson, Fred E. Regnier: *Electrophoretically mediated microanalysis of ethanol*. Journal of Chromatography A 657 (1993): 429-434
- [62] Dale H. Patterson, Bryan J. Harmon, Fred E. Regnier: *Electrophoretically mediated microanalysis of calcium*. Journal of Chromatography A 662 (1994): 389-395
- [63] Qingfu Zhu, Rabab G. El-Mergawy, Stefan H. Heinemann, Roland Schönherr, Pavel Jáč, Gerhard K. E. Scriba: *Stereospecific electrophoretically mediated microanalysis assay for methionine sulfoxide reductase enzymes*. Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014): 1723–1729

- [64] Hala Nehmé, Reine Nehmé, Pierre Lafite, Sylvain Routier, Philippe Morin: *In-capillary reactant mixing for monitoring glycerol kinase kinetics by CE*. J. Sep. Sci. 36 (2013): 2151–2157
- [65] Cui Lai, Guang-Ming Zeng, Dan-Lian Huang, Mei-Hua Zhao, Ming Chen, Zhen Wei, Chao Huang, Piao Xu, Ning-Jie Li, Xue Lic, Chen Zhang: *Colorimetric screening of β -glucosidase inhibition based on gold nanocomposites*. Anal. Methods 6 (2014): 312-315
- [66] Bingbing Wang, Liming Xia: *High efficient expression of cellobiase gene from *Aspergillus niger* in the cells of *Trichoderma reesei**. Bioresource Technology 102 (2011): 4568–4572
- [67] M. Jaroš, M. Štědrý, V. Hruška, I. Zusková, B. Gaš. Dostupné z URL <<http://web.natur.cuni.cz/gas/>> [cit. 15. 4. 2014]